



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL
(ÁREA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL)

TESIS DOCTORAL

**Mecanismos de incorporación y homeostasis
citoplasmática de potasio y de sodio en
Halimione portulacoides (L.) Aellen**





UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL
(ÁREA DE FISIOLOGÍA VEGETAL)

TESIS DOCTORAL


Mecanismos de incorporación y homeostasis
citoplasmática de potasio y de sodio en
***Halimione portulacoides* (L.) Aellen**

KARIMA AIT HAMMOU
Enero 2016



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Karima Ait Hammou

 <https://orcid.org/0000-0003-1173-3376>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Vegetal

(Área de Fisiología Vegetal)

Programa de Doctorado

Análisis y Gestión de Paisajes Mediterráneos

Visado en Málaga
a 16 Noviembre de 2015
Las directoras



Fdo. Dra. Dª. Mª Jesús García Sánchez
Profesora Titular de Fisiología Vegetal
Universidad De Málaga

Fdo. Dra Dª. Lourdes Rubio Valverde
Profesora contratada de Fisiología Vegetal
Universidad De Málaga

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga

Fdo. Dª. KARIMA AIT HAMMOU



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento De Biología Vegetal

(Área de Fisiología Vegetal)

D^a. MARÍA JESÚS GARCÍA SÁNCHEZ, Profesora Titular de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad De Málaga y D^a. LOURDES RUBIO VALVERDE, Profesora Contratada Doctora de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad De Málaga.

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación: **Mecanismos de incorporación y homeostasis citoplasmática de potasio y de sodio en *Halimione portulacoides* (L.) Aellen**, realizado por D^a. KARIMA AIT HAMMOU, desarrollado bajo nuestra dirección en el Dpto. de Biología Vegetal (área de Fisiología Vegetal) de la Universidad de Málaga, se considera finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral.



Fdo. Dra. D^a. María Jesús García Sánchez

Fdo. Dra. D^a. Lourdes Rubio Valverde

Málaga, a dieciséis de Noviembre de dos mil quince

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a una Beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo (AECID) del Ministerio de Asuntos Exteriores (BOE-A-2007-15995).

El trabajo ha sido desarrollado dentro del grupo de investigación de la Junta de Andalucía *Ecofisiología de Sistemas Acuáticos* (RNM 176) y ha sido financiado principalmente por el proyecto de investigación *Homeostasis citoplasmática de Na^+ , K^+ y Cl^- y mecanismos de incorporación de nutrientes en *Sarcocornia sp.** (CGL2007-66362/BOS) y también por el proyecto de referencia CGL2011-30356.

Parte de los resultados incluidos en esta memoria han sido presentados en el *Annual Main Meeting of the Society for Experimental Biology* (Junio 2009, Glasgow, UK) y en la *XIX Reunión Española de la Sociedad de Fisiología Vegetal* (Junio 2011, Castellón, España). Además, parte de esta tesis conforma el artículo: Ait Hammou K, Rubio L, Fernández JA, García-Sánchez MJ (2014). Potassium uptake in the halophyte *Halimione portulacoides* L. Aellen. *Environmental Experimental Botany* 107,15-24.

*Quand tout va mal, comme c'est parfois le cas.
Quand la vie semble dure et pleine de tracas.
Quand vous voulez sourire mais que les larmes perlent.
Quand demain semble loin et que le moral est bas.
Reprenez votre souffle, mais n'abandonnez pas!*

[...]

*La vie n'est pas facile si l'on veut réussir,
Gardez toujours l'espoir et le succès viendra!
Rien ne s'obtient jamais sans en payer le prix,
Le succès ne dépend que de la volonté.
C'est le fruit du labeur et de l'assiduité.
Persévérez toujours, envers et contre tout.
Gardez la tête haute au plus dur du combat.
Reprenez votre souffle, mais n'abandonnez pas.*

N'abandonnez pas. Anónimo

Agradecimientos

Este trabajo lo he podido hacer gracias a ALAH, quien me dió fuerzas para aguantar todas las dificultades que he encontrado en mi camino.

Mis agradecimientos van en primer lugar a mis directoras María Jesús García Sánchez y Lourdes Rubio Valverde, que han hecho posible que esta tesis se lleve a cabo. Gracias a mis jefas, que me ayudaron desde el principio y me apoyaron en todo mi camino. Gracias por darme la oportunidad de entrar en un dominio tan interesante como la electrofisiología. Gracias por animarme para terminar esta tesis. Y no puedo olvidarme tampoco de José Antonio Fernández, que supervisaba el trabajo en todo momento. Gracias, José Antonio.

*También tengo que agradecer a Xavier Niell y Carlos Jiménez que me permitieron matricularme en el programa de doctorado de *Análisis y Gestión de Paisajes Mediterráneos*.*

Tampoco puedo olvidar a mi amiga Meriem que me ayudó a conseguir la beca de la AECTD, a la que también estoy agradecida.

A Farah y su esposo. A Farah, que me ayudó en momentos difíciles, cuando no sabía defenderme en el idioma que tuve que aprender rápido para integrarme. Y gracias a Francisco J. Gámez, mi profesor de español.

A través de este trabajo quiero rendir homenaje a mi hermana TAOUS y a mi padre ABDERRAHMENE, que quisiera que estuvieran todavía con nosotros. Que descansen en paz.

Esta tesis la dedico a mi querida madre TASSADIT. Esta madre que nunca me ha fallado. Siempre estaba a mi lado en todo momento, especialmente cuando tenía la moral por los suelos. Me animaba a su manera, me daba energía cuando me faltaba y me ayudaba mucho para superar todas las dificultades. Me daba adrenalina para ser fuerte y no volver atrás. A mi madre, que nunca quiso que dejara mi tesis. A esta madre que le hacía ilusión ver a sus hijos llegar lejos. No puedo agradecerse lo suficiente porque sin ella, esta tesis no la hubiera terminado.

A mí querida hermana ZOËRA. Ella estaba presente siempre que la necesitaba y me apoyaba en todo momento. Nunca dijo no puedo, o no tengo tiempo. Gracias, ZOËRA.

A mis queridos hermanos HOÛNE, SMAÏL e IBRAHÏM. No olvido vuestro ánimo y vuestro consuelo. Gracias a vosotros. A mis queridos y preciosos sobrinos ABDERRAHMÈNE, YOUSRA, INÈS, KENZÏ, MERIEM, RYM, WASSIM y AMINÀ. Os adoro mucho.

A mí querido esposo ABDELHAKIM, que siempre esta a mi lado, y que en mis momentos de desesperanza me hacía bromas para tener la moral alta. A mi marido, que siempre me recordaba que tenía que terminar la tesis. Siempre animándome para terminarla, haciéndome todo fácil. Gracias, Hakim.

A mis cuñados (as),especialmente ASSIA que siempre se preocupaba por mí. Gracias a toda mi familia que me apoyó desde el comienzo. A mi tío BRAHÏM y su esposa, gracias por haberme abierto su casa en París y preocuparse por mí.

A mis paisanos y compañeros Fatiha, Títouh, Fares, Fidaa, con quienes tuve una complicidad que nos permitió seguir adelante y olvidar un poco la nostalgia y la distancia que nos alejaba de nuestra querida tierra. Y sigo estando todavía más lejos.

A mis compañeras del laboratorio Delia y, especialmente, a Bea, con quien he pasado buenos momentos. Acuérdate, Bea, de nuestras salidas de muestreo. Que seas feliz.

A mis compañeros del laboratorio CIV, Nieves, Juan, M^a del Mar, Sergio, Elena, Sara, Candelas, Javi, Rafa. Y a la gente de Ecología, María Ángeles, Miriam, Raquelita...Y también a Fernando, José Ángel, Carolina, Miguel Ángel, Antonio, María Dolores, Marga, Jesús...Gracias también a Lola, Eva y Concha, que fueron siempre amables conmigo.

A mi mejor amiga KARIMA. Gracias por seguir siendo mi amiga a pesar de la distancia que nos separa. Gracias a mis amigas de Argel, Nadia, Meriem y Samia; y a mis amigas de Montréal, Yasmine y Lamia. Y sin olvidar a Abdelkrim y Bernard Milliet y su esposa Evelyne.

A las personas que he olvidado les pido perdón.

A mí madre
A mí esposo

Abreviaturas.

Bis Tris Propano	1,3-bis [tris (hidroximetil) metilamino] propano
D_{max}	Despolarización máxima
ΔE_m	Despolarización de la membrana
$\Delta \mu/F$	Gradiente de potencial electroquímico
E_m	Potencial de membrana
E_j^N	Potencial de Nernst para el ión "j"
E_D	Potencial de difusión
K_c^+	Actividad Citoplasmática de K^+
Na_c^+	Actividad Citoplasmática de Na^+
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_{mapp}	Constante de Michaelis-Menten aparente
MES	Ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfónico
P_K^+	Permeabilidades de la membrana para el ion K^+
P_{Na}^+	Permeabilidades de la membrana para el ion Na^+
P_{Cl}^-	Permeabilidades de la membrana para el ion Cl^-
PVC	Cloruro de polivinilo
SHAM	Ácido salicil hidroxámico
TEA^+	Cloruro de tetraetilamonio
THF	Tetrahidrofurano
V_{max}	Velocidad máxima del transportador
γ	Coeficiente de actividad
$[]_e$	Concentración externa de los iones
$[]_i$	Concentración interna de los iones

ÍNDICE

I. Introducción	3
I.1. Las plantas halófitas: aspectos generales de la tolerancia a la salinidad	3
I.2. Mecanismos de tolerancia a la salinidad en halófitos	5
I.2.1. Ajuste osmótico, compartimentación de iones y solutos compatibles	5
I.2.2. Suculencia. Glándulas y vesículas de sal	7
I.2.3. Homeostasis citoplasmática de Na^+ y K^+	8
I.2.4. Incorporación de K^+	10
I.2.5. Incorporación de Na^+	13
I.3. <i>Halimione portulacoides</i> (L.) Aellen	16
I.4. Objetivos	20
II. Material y Métodos	23
II.1. Material vegetal	23
II.1.1. Taxonomía, morfología y distribución de <i>Halimione portulacoides</i>	23
II.1.2. Germinación de semillas y cultivo de plántulas	26
II.2. Electrofisiología	28
II.2.1. Medida del potencial de membrana	28
II.2.1.1. Medida del flujo de iones mediante la medida del potencial de membrana	30
II.2.2. Medida de la actividad iónica: fabricación de microelectrodos selectivos para iones	32
II.2.2.1. Microelectrodos de potasio: medida de actividades de K^+	34
II.2.2.1.1. Minielectrodos de K^+	36
II.2.2.2. Microelectrodos de sodio: medida de actividades de Na^+	36
II.3. Diseño experimental	38
II.3.1. Caracterización del transporte de K^+ en <i>H. portulacoides</i>	38
II.3.1.1. Incorporación de K^+ : experimentos de depleción en raíces	38
II.3.1.2. Caracterización electrofisiológica del transporte de K^+ en células radiculares de plántulas crecidas en ausencia de Na^+	39
II.3.1.2.1. Efecto de la adición de K^+ sobre el potencial de membrana	39
II.3.1.2.2. Efecto de la adición de Rb^+ y de Cs^+ sobre el potencial de membrana	40
II.3.1.2.3. Efecto del Rb^+ y del Cs^+ sobre el transporte de K^+ . Cálculo de la K_i	40
II.3.1.2.4. Efecto del Na^+ sobre el transporte de K^+	41

II.3.1.3. Caracterización electrofisiológica del transporte de K^+ en células radiculares de plántulas crecidas en presencia de Na^+ : efecto de la salinidad	41
II.3.1.3.1. Efecto de la adición K^+ sobre el potencial de membrana	41
II.3.1.4. Efecto de distintos inhibidores e iones sobre el transporte de K^+ en plántulas crecidas a salinidad creciente	42
II.3.1.4.1. Efecto del Cs^+ , Ba^{2+} y TEA^+	42
II.3.1.4.2. Efecto del pH	43
II.3.1.4.3. Efecto del NH_4^+	43
II.3.1.5. Medida de la actividad citoplasmática de K^+ . Cálculo del gradiente de potencial electroquímico para K^+	44
II.3.2. Caracterización del transporte de Na^+ en <i>H. portulacoides</i>	44
II.3.2.1. Incorporación de Na^+ : experimentos de depleción en raíces	45
II.3.2.2. Caracterización electrofisiológica del transporte de Na^+ en células radiculares	45
II.3.2.2.1. Efecto de la adición de Na^+ sobre el potencial de membrana	45
II.3.2.3. Efecto de distintos inhibidores e iones sobre el transporte de Na^+	45
II.3.2.3.1. Efecto del Rb^+ , Cs^+ y Ba^{2+}	46
II.3.2.3.2. Efecto del pH	46
II.3.2.3.3. Efecto del Li^+ y del Ca^{2+}	47
II.3.2.3.4. Efecto de la presencia de Na^+ y K^+ en el medio de cultivo	47
II.3.2.4. Medida de la actividad citoplasmática de Na^+ . Cálculo del gradiente de potencial electroquímico para Na^+	48
II.3.3. Homeostasis de Na^+ en <i>H. portulacoides</i>	48
II.3.3.1 Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de plántulas	48
II.3.3.2 Determinación de los contenidos totales de K^+ y Na^+ en tejidos de plántulas crecidas en ausencia y presencia de Na^+	49
II.3.3.3 Determinación de la permeabilidad relativa del Na^+ con respecto al K^+ (P_{Na^+}/P_{K^+}) en ausencia y presencia de Na^+	49
II.3.3.4. Efecto de la concentración externa de Na^+ sobre la actividad citoplasmática de este ión en plántulas crecidas con o sin Na^+ .	51
II.4. Tratamiento de los datos	51
III. Resultados	55
III.1. Caracterización del transporte de K^+ en <i>H. portulacoides</i>	55
III.1.1. Incorporación de K^+ en raíces	55
III.1.2. Transporte de K^+ en células radiculares de plántulas crecidas en ausencia de Na^+	55

III.1.2.1. Cinética de incorporación de K^+ en células de la raíz	55
III.1.2.1.1. Cinéticas de incorporación de Rb^+ y de Cs^+	57
III.1.2.2. Efecto del Rb^+ y del Cs^+ sobre el transporte de K^+	58
III.1.2.2.1. Cinéticas de incorporación de K^+ en presencia de Rb^+	58
III.1.2.2.1.1. Tipo de inhibición. Cálculo de la K_i	60
III.1.2.2.2. Cinética de incorporación de K^+ en presencia de Cs^+	61
III.1.2.3. Efecto del Na^+ sobre el transporte de K^+	62
III.1.3. Transporte de K^+ en células radiculares de plántulas crecidas en presencia de Na^+ : efecto de la salinidad	64
III.1.4. Efecto de distintos inhibidores e iones sobre el transporte de K^+ en plántulas cultivadas a salinidad creciente	65
III.1.4.1. Efecto del Cs^+	66
III.1.4.2. Efecto del TEA^+	67
III.1.4.3. Efecto del Ba^{2+}	68
III.1.4.5. Efecto del pH sobre el transporte de K^+	70
III.1.4.6. Efecto del NH_4^+	71
III.1.5. Actividad citoplasmática de K^+ en células radiculares. Cálculo del $\Delta\mu K^+/F$	75
III.2. Caracterización del transporte de Na^+ en <i>H. portulacoides</i>	77
III.2.1. Incorporación de Na^+ en raíces	77
III.2.2. Transporte de Na^+ en células radiculares	78
III.2.3. Efecto del Rb^+ , Cs^+ y Ba^{2+} sobre el transporte de Na^+	79
III.2.4. Efecto de la presencia de K^+ y Na^+ en el medio de crecimiento sobre el transporte de Na^+	80
III.2.5. Efecto del Li^+ , Ca^{2+} y pH sobre la incorporación de Na^+	82
III.2.6. Actividad citoplasmática de Na^+ en células radiculares. Cálculo del $\Delta\mu Na^+/F$	84
III.3. Homeostasis citoplasmática de Na^+ en <i>H. portulacoides</i>	86
III.3.1. Efecto del Na^+ sobre el crecimiento de plántulas y sobre los contenidos totales de Na^+ y K^+	86
III.3.2. Efecto del Na^+ sobre la permeabilidad relativa Na^+/K^+ en células epidérmicas de la raíz	87
III.3.3. Efecto de la concentración externa de Na^+ sobre la actividad citoplasmática de Na^+ en plántulas crecidas en ausencia del mismo	90
III.3.4. Efecto de la concentración externa de Na^+ sobre la actividad citoplasmática de Na^+ en plántulas crecidas en presencia del mismo	92

III.3.5. Efecto de la adición de inhibidores de la respiración sobre la actividad citoplasmática de Na^+ en plántulas crecidas en ausencia o en presencia de Na^+	94
IV. Discusión	99
IV.1. Transporte de K^+	99
IV.2. Transporte de Na^+	105
IV.3. Homeostasis citoplasmática de K^+ y Na^+	110
IV.3. Modelo de incorporación y homeostasis de Na^+ y K^+ en <i>H. portulacoides</i>	118
V. Conclusiones	125
VI. Bibliografía	129
VII. Índice de Figuras	145
VIII. Índice de Tablas	151
Anexo	153

INTRODUCCIÓN

I. Introducción

I.1. Las plantas halófitas: Aspectos generales de la tolerancia a la salinidad

Los halófitos constituyen la flora natural de los suelos salinos y representan el 1% de la flora mundial. Así, estas plantas crecen en una gran variedad de ambientes salinos desde regiones costeras, como las marismas, a desiertos de interior, salares y estepas. Aunque se trata de una definición arbitraria, se considera que los halófitos son las plantas capaces de completar su ciclo de vida a concentraciones de sal (siendo el NaCl el tipo dominante) mayores o iguales a 200 mM (Flowers *et al.*, 1986; Flowers y Colmer, 2008) y que, por tanto, se benefician de poseer cantidades substanciales de sal en el medio externo (Shabala, 2013). El resto de las especies menos tolerantes a la salinidad son denominadas glicófitas. Por otra parte, el hecho de incluir en la definición el ciclo de vida excluye a aquellas especies que toleran la salinidad pero que no viven habitualmente en suelos salinos (Flowers y Colmer, 2008). Siguiendo esta definición se considera que existen unas 350 especies de halófitas, que no se encuentran uniformemente distribuidas entre los taxones de las plantas con flores. Los órdenes con el mayor número de halófitos son las Cariofilales, que incluyen a géneros como *Atriplex*, *Salicornia* o *Suaeda*, y las Alismatales, que incluyen a géneros de plantas marinas como *Zostera* y *Thalassia* (Flowers *et al.*, 2010). La distribución de las halófitas en diferentes familias indica un origen polifilético (Flowers *et al.*, 1977), lo que explica que estas plantas empleen diferentes mecanismos de tolerancia a la salinidad (Flowers *et al.*, 2010).

La salinización del suelo puede ocurrir por causas naturales, tales como la geología local o la proximidad a zonas costeras, o ser causada por el hombre, por ejemplo, mediante el uso de agua de riego con altas concentraciones de sales (Maathuis, 2013). Además, la difusión de prácticas de riego no adaptadas a la variabilidad edáfica, el clima y los cultivos, con agua de mala calidad (Pitman y Läuchli, 2004), se traduce en una progresiva salinización del suelo. La salinidad del suelo puede producir estrés en las plantas de dos maneras (Munns y Tester, 2008). Las altas concentraciones de sal hacen que sea más difícil para las raíces extraer agua del suelo, al tener éste un potencial hídrico muy negativo, causando por tanto estrés hídrico a la planta, y una inhibición del crecimiento. Y, por otro lado, las sales pueden afectar al crecimiento celular y al metabolismo, debido a la toxicidad de los iones (estrés iónico). Así, el sodio y el cloro

pueden tener efectos tóxicos directos en las membranas y los sistemas enzimáticos. Otro efecto secundario del estrés salino es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que resultan especialmente destructivas para los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (Kant *et al.*, 2006; Türkan y Demiral, 2009) y también para la maquinaria fotosintética. Una de las consecuencias de la generación de ROS es la acumulación de aldehídos altamente tóxicos, que son metabolizados por aldehído deshidrogenasas (Flowers *et al.*, 2015). Así, el estrés salino, como otros tipos de estrés, inhibe el crecimiento de la planta. Una causa de la reducción del crecimiento es una menor tasa de fotosíntesis debida al cierre estomático y en consecuencia la limitación de la entrada de CO₂. Más importante es, sin embargo, que el estrés inhibe directamente la división y expansión celular (Munns y Tester, 2008). De hecho, el bajo crecimiento de las plantas en zonas salinas es una característica adaptativa de las plantas para sobrevivir a este tipo de estrés. Así, en la naturaleza la capacidad de tolerar la salinidad o la sequía parece estar inversamente relacionada con la tasa de crecimiento. Sin embargo, los halófitos pueden crecer muy rápidamente en condiciones salinas, aunque el crecimiento disminuye cuando se alcanzan salinidades supraóptimas (Flowers y Colmer, 2008). La explicación de este último fenómeno no se conoce todavía, pero se cree que puede estar relacionada con la demanda energética de los procesos esenciales que determinan la tolerancia a la salinidad (Yeo, 1983; Flowers y Colmer, 2008).

Se sabe que la tolerancia a la salinidad es un carácter complejo y que, como mínimo, requiere la combinación de diferentes caracteres: la acumulación y la compartimentación de iones para conseguir el ajuste osmótico; la síntesis de solutos compatibles; la capacidad para acumular nutrientes esenciales (especialmente K⁺) en presencia de concentraciones altas de otros iones, especialmente Na⁺; la capacidad para limitar la entrada de los iones Na⁺ y Cl⁻ en la corriente transpiratoria, y relacionada con ésta, la capacidad de regular la transpiración en presencia de altas concentraciones de estos iones (Flowers y Colmer, 2008; Flowers *et al.*, 2010). Además, la tolerancia a la salinidad a menudo forma parte de un síndrome más complejo que incluye también la tolerancia a la inundación (Colmer y Flowers, 2008) y a la sequía. Todas las plantas, no sólo los halófitos, poseen los mecanismos principales necesarios para tolerar la salinidad (por ejemplo, la compartimentación en vacuolas o la discriminación en la incorporación de K⁺ frente a Na⁺). Ello explica que las plantas se distribuyan en un continuo de tolerancia donde en un extremo se encuentran las especies de glicófitas que

no pueden tolerar ni 25 mM NaCl y en el extremo opuesto, los halófitos, que pueden tolerar concentraciones tan altas como 500-1000 mM (Flowers *et al.*, 2010).

I.2. Mecanismos de tolerancia a la salinidad en halófitos

I.2.1. Ajuste osmótico, compartimentación de iones y solutos compatibles

Para que las plantas puedan crecer en un suelo salino necesitan ajustarse osmóticamente para mantener así una diferencia de potencial hídrico que permita extraer agua del suelo. Ello es posible por la acumulación de solutos en el interior celular. Así, se ha estimado que el potencial osmótico celular debería alcanzar valores próximos a -3 MPa (Flowers *et al.*, 2015) a salinidades próximas al agua de mar (con un potencial osmótico de -2,3 MPa, equivalente a 530 mM NaCl) para mantener así la presión de turgencia celular. Está ampliamente aceptado que la presión de turgencia se mantiene por el almacenamiento de Na^+ y Cl^- en las vacuolas, de modo que el potencial de solutos en el citoplasma se ajusta por la acumulación de K^+ y solutos orgánicos (Flowers *et al.*, 1977; Glenn *et al.*, 1999). Así, los halófitos pueden mostrar concentraciones de Na^+ y Cl^- por encima de 500 mM (Flowers, 1985).

El secuestro de los iones Na^+ y Cl^- en las vacuolas permite que sus concentraciones en el citoplasma se mantengan dentro de límites tolerables (Wyn Jones y Gorham, 2002). Ello requiere la presencia en el tonoplasto de transportadores de iones (antiportadores) y de bombas vacuolares (la H^+ -ATPasa, V-ATPasa, y la H^+ -pirofosfatasa, V-PP_iasa, Fig. 1B) capaces de generar el gradiente de potencial electroquímico necesario para dicho transporte. Por otra parte, dichas bombas mantienen el potencial de membrana que, a su vez, controla la actividad de los canales presentes en el tonoplasto (Munns y Tester, 2008; Hasegawa, 2013; Shabala, 2013). No obstante, en los escasos estudios llevados a cabo en algunas raíces de especies halófitas no siempre se ha observado una relación directa entre la salinidad y la actividad antiporte Na^+/H^+ y la de las bombas del tonoplasto, lo que pone en cuestión la importancia de este mecanismo en raíces en la tolerancia a la salinidad (Shabala y Mackay, 2011); sin embargo, sí se ha observado esta relación en hojas. A diferencia de los glicófitos, los antiportadores Na^+/H^+ del tonoplasto NHX (Fig. 1B), que pertenecen a la familia CPA de antiportadores catión/protón (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009), se expresan constitutivamente en las hojas de los halófitos (Barkla *et al.*, 1995; Glenn *et*

al., 1999). Además, su actividad aumenta en condiciones salinas, como se ha demostrado para *Salicornia* (Parks *et al.*, 2002) o *Atriplex gmelinii* (Hamada *et al.*, 2001), donde además se consiguió aislar y caracterizar el gen responsable de su codificación (*AgNHX1*). De igual modo, la salinidad da lugar a un incremento en la actividad de la V-ATPasa del tonoplasto en hojas de halófitos, mientras que en glicófitos se mantiene constante o disminuye (Wang *et al.*, 2001; Shabala y Mackay, 2011). Sin embargo, el papel de la V-PP_iasa no está tan claro (Shabala y Mackay, 2011). En cuanto a la entrada de Cl⁻ en la vacuola de los halófitos aún se sabe menos, aunque podría producirse a través de un antiportador con protones y/o canales aniónicos (Flowers y Colmer, 2008). Por otra parte, también se desconoce cómo se produce la entrada de Cl⁻ en el citoplasma, aunque dada la alta concentración de este ión en ambientes salinos, dicha entrada se podría producir a través de canales aniónicos siempre que la concentración en el citoplasma permanezca baja (Tyerman y Skerret, 1999; White y Broadley, 2001). Aparte de estos mecanismos de transporte, es necesario que la membrana del tonoplasto sea poco permeable al Na⁺ y al Cl⁻, de modo que estos se retengan eficientemente en la vacuola (Shabala, 2013). Esta baja permeabilidad se ha relacionado con la baja actividad de canales slow-vacuolar (SV) como, por ejemplo, ocurre en hojas viejas de la halófito *Chenopodium quinoa*, comparado con hojas jóvenes (Bonales-Alatorre *et al.*, 2013). Finalmente, se ha sugerido que la composición lipídica del tonoplasto podría contribuir también a evitar la salida de Na⁺ (Glenn *et al.*, 1999).

En relación con la compartimentación de Na⁺, aparte de los transportadores NHX del tonoplasto, responsables de la entrada del ión Na⁺ en las vacuolas, hay que mencionar el papel de los antiportadores SOS1, presentes en la membrana plasmática (Fig. 1B), que se asume están implicados en la salida de Na⁺ desde el citoplasma en antiporte con protones (Apse y Blumwald, 2007). No obstante, hay muy pocos estudios sobre este transportador en halófitos. Así, se ha detectado actividad constitutiva del transportador Na⁺/H⁺ en hojas de *Mesembryantum*, y que dicha actividad aumenta cuando las plantas se crecen en NaCl (Barkla *et al.*, 2002). Se ha demostrado también la presencia de SOS1 en vesículas de membrana obtenidas de raíces y tallos en *Thellungiella halophila* (Vera-Estrella *et al.*, 2005); además la expresión de este gen se produce en ausencia de sal y aumenta en plantas cultivadas en presencia de NaCl (Taji *et al.*, 2004). No obstante, no se llegó a observar actividad de este transportador en ensayos de transporte en vesículas (Vera-Estrella *et al.*, 2005), lo que se atribuye a la

falta de moléculas reguladoras en los ensayos *in vitro*. Sin embargo, en la halófito acuática *Zostera marina* sí se ha detectado actividad antiporte Na^+/H^+ en vesículas de membrana plasmática obtenidas de hojas (Rubio *et al.*, 2011).

La acumulación de solutos metabólicamente compatibles en el citoplasma es necesaria para equilibrar el potencial osmótico del Na^+ y Cl^- almacenado en la vacuola (Wyn Jones y Gorham, 2002). Se ha propuesto que diversos tipos de solutos como azúcares (ej. sorbitol), azúcares alcoholes (ej. manitol), aminoácidos (ej. prolina), betaínas (ej. glicina-betaína), entre otros, pueden actuar como solutos compatibles (Flowers y Colmer, 2008). De entre estos, los más comunes son la glicina-betaína y la prolina, que se encuentran en un gran número de familias. La síntesis de estos compuestos es constitutiva en algunas especies (Khan *et al.*, 1998), mientras que en otras, algunos compuestos se sintetizan constitutivamente y otros se modulan por la salinidad (Colmer *et al.*, 1996). No obstante, hay que señalar que la concentración de solutos orgánicos, típicamente entre 20-150 mM (Shabala y Mackay, 2011), está normalmente por debajo de la necesaria para equilibrar la concentración de solutos en la vacuola (500-600 mM Na^+ , Maathuis *et al.*, 1992). Así, se ha sugerido que estos solutos podrían tener también una función osmoprotectora y/o de protección contra las especies reactivas de oxígeno (Shabala y Mackay, 2011).

I.2.2. Suculencia. Glándulas y vesículas de sal

Al igual que algunos glicófitos, algunas especies de halófitos pueden engrosar sus tejidos foliares incrementando así el volumen de líquido tisular. Se ha sugerido que la suculencia se incrementa con la salinidad como una respuesta directa al necesario aumento del área para el almacenamiento de Na^+ y Cl^- (Hajibagheri *et al.*, 1984). Es decir, los altos niveles de sal son parcialmente compensados con un alto almacenamiento de agua, diluyéndose así las concentraciones de iones (Schirmer y Breckle, 1982). Este mecanismo es típico de géneros como *Salicornia* o *Arthrocnemum*, con tallos suculentos, o en *Salsola* o *Suaeda*, que presentan hojas suculentas (Schirmer y Breckle, 1982).

La presencia de glándulas y vesículas de sal es una adaptación típica de algunos halófitos. Ambas estructuras derivan de células epidérmicas y son tricomas modificados (Adams *et al.*, 1998). La diferencia entre ambas estructuras se basa en que las glándulas

extruyen sal de manera regular, y las vesículas sólo de una vez, cuando se rompen tras un largo periodo de acumulación (Shabala y Mackay, 2011). Aproximadamente el 50% de las especies halófitas contienen vesículas de sal, de modo que son capaces de secuestrar el exceso de Na^+ y Cl^- , limitando su acceso a células metabólicamente activas (Shabala *et al.*, 2014). Estas estructuras podemos encontrarlas en especies de los géneros *Chenopodium*, *Obione*, *Halimione*, *Salsola*, y en *Atriplex*, donde se cree que es la principal estructura relacionada con la tolerancia a la salinidad (Schirmer y Breckle, 1982). El diámetro de la vesícula es a menudo 10 veces mayor que el de las células epidérmicas, con lo cual tienen un volumen 1000 veces mayor y, por tanto, pueden secuestrar 1000 veces más Na^+ que la vacuola de una célula foliar (Shabala *et al.*, 2014).

Tanto la succulencia como la existencia de glándulas y vesículas de sal se han relacionado con estrategias incluseras en respuesta al ambiente salino, frente a estrategias excluseras, basadas en una alta selectividad iónica a nivel de la raíz, típica de glicófitos (Schirmer y Breckle, 1982, Shabala *et al.*, 2014). Así, se ha planteado que podrían existir diferencias en el control del transporte de Na^+ y la expresión de los transportadores de este ión entre especies halófitas que presenten o no glándulas/vesículas de sal (Shabala y Mackay, 2011).

I.2.3. Homeostasis citoplasmática de Na^+ y K^+

Se sabe que incluso las especies de halófitos más tolerantes a la salinidad mueren cuando se llegan a alcanzar concentraciones de 2 M NaCl en la rizosfera (English y Colmer, 2013). Ello se ha relacionado, entre otros factores, con la toxicidad de Na^+ y/o Cl^- citoplasmáticos sobre el metabolismo. La concentración a la que estos iones son capaces de inducir toxicidad está en discusión puesto que en la literatura la mayoría de los estudios realizados con distintos enzimas se han realizado *in vitro*, y el comportamiento de éstos podría ser distinto *in vivo*, donde los enzimas pueden formar complejos (Flowers *et al.*, 2015; Cheeseman, 2013). Así, apoyándose en estudios realizados en ribosomas se ha sugerido que una concentración de 100 mM Na^+ (en presencia de 100 mM K^+) sería tolerable y que el ión Cl^- tendría un efecto inhibitor mayor que el Na^+ , siendo el Cl^- tóxico a concentraciones mayores de 80 mM (Flowers *et al.*, 2015). No obstante, la concentración de Na^+ que se ha medido en el citoplasma de algas marinas no es tan elevada y oscila entre 20 y 60 mM (Raven, 1976; Hajibgheri *et*

al., 1986; Amtmann y Gradmann, 1994). Por otra parte, en la halófito acuática *Z. marina* se ha detectado una concentración citoplasmática en células de raíces y hojas inferior a 20 mM, medidas realizadas *in vivo* con microelectrodos sensibles a este ión por nuestro grupo de investigación (Rubio *et al.*, 2005, Rubio *et al.*, 2011). Este valor además es muy próximo al obtenido en plantas glicófitas usando la misma técnica (Carden *et al.*, 2003). No obstante, los datos que se conocen sobre el contenido citoplasmático de Na^+ en halófitos terrestres se han realizado mediante análisis de flujo con $^{22}\text{Na}^+$ o con microanálisis por rayos-X asociado a microscopía electrónica de transmisión (Flowers *et al.*, 2015 y referencias incluidas en dicho trabajo). Analizando estos datos Flowers y colaboradores concluyen que la concentración citoplasmática de Na^+ en halófitos terrestres se encontraría en el rango 100-200 mM (Flowers *et al.*, 2015), concentración mucho mayor a la indicada para algas marinas.

El K^+ es un ión esencial para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Es el catión más abundante en las células, constituye 10 % del peso seco de la planta, y está involucrado en diversas funciones fisiológicas (Marschner, 1995). Por tanto, la homeostasis del K^+ en el citoplasma es muy importante para el metabolismo de la célula, especialmente en condiciones salinas. Así, en glicófitas se ha observado que, en presencia de sal, el contenido de Na^+ en el citoplasma aumenta mientras que el de K^+ disminuye (Cuin y Shabala, 2006). De hecho, el estrés salino puede inducir la muerte celular por la disminución de la concentración de K^+ citosólico por debajo de su nivel umbral (Anschütz *et al.*, 2014; Shabala y Pottosin, 2014). Se ha propuesto que las principales vías de pérdida de K^+ inducida por la salinidad en el tejido radicular serían a través de canales rectificadores de salida de K^+ (KOR) activados por despolarización y por canales catiónicos no selectivos (NSCCs) activados por ROS (Shabala y Cuin, 2008). El mantenimiento de la homeostasis de K^+ es fundamental, por tanto, para la supervivencia en ambientes salinos tanto de las plantas glicófitas como de las plantas halófitas (Volkov *et al.*, 2004; Volkov y Amtmann, 2006). Así, una de las propuestas fundamentales sobre la tolerancia a la salinidad es que ésta viene determinada por el mantenimiento de una proporción K^+/Na^+ adecuada en citoplasma (Maathuis y Amtmann, 1999). Tal y como se ha comentado anteriormente para el Na^+ , las medidas de K^+ en el citoplasma de plantas halófitas son escasas y se han realizado mediante análisis de flujo de $^{86}\text{Rb}^+$ o $^{42}\text{K}^+$ o por técnicas de microscopía. Así, se ha estimado que la concentración de K^+ oscila en células radiculares entre 30-200 mM K^+ (Flowers *et*

al., 2015). Con estos datos se ha propuesto que, en tejidos jóvenes de los halófitos, la proporción Na^+/K^+ citoplasmática oscilaría entre 0,5-1 (Flowers *et al.*, 2015). Dichos autores, sin embargo, reconocen que sería necesario realizar medidas directas con microelectrodos para obtener medidas más fiables tanto de Na^+ como de K^+ citoplasmáticas, pero hasta el momento dichas medidas no se han realizado en halófitos terrestres.

En cualquier caso, el mantenimiento de una concentración citoplasmática de Na^+ en niveles tolerables, dependerá de los mecanismos de entrada y salida de este ión en el citoplasma, así como de entrada en la vacuola. Igualmente en el mantenimiento de la ratio Na^+/K^+ es fundamental tanto el proceso de entrada de K^+ , como la capacidad para retenerlo en los tejidos (Shabala y Mackay, 2011). Así, los procesos de incorporación de ambos iones se analizan a continuación.

I.2.4. Incorporación de K^+

Las plantas halófitas, al contrario que las glicófitas, consiguen crecer en medios salinos manteniendo una proporción K^+/Na^+ alta. Uno de los mecanismos que participan en mantener una ratio K^+/Na^+ adecuada es la incorporación selectiva del K^+ , a pesar de la competencia notable de Na^+ (Maathuis y Amtmann, 1999). Por otro lado, dado que las halófitas utilizan el Na^+ para el ajuste osmótico, éstas plantas tienen que ser capaces de elegir al K^+ entre una mezcla de iones dominada por el Na^+ y, al mismo tiempo, acumular suficiente Na^+ para la regulación osmótica (Flowers y Colmer, 2008). Sin embargo, a pesar de la importancia del mecanismo de incorporación de K^+ para la tolerancia de la salinidad en las halófitas, hay pocos estudios publicados sobre este tema. Por el contrario, existe mucha información sobre los glicófitos.

La incorporación de K^+ en glicófitos ocurre siguiendo un modelo bifásico, siendo la suma de dos mecanismos que funcionan en paralelo en el plasmalema. Este modelo fue descrito por primera vez en cebada por Epstein *et al.*, 1963 y un comportamiento similar se ha encontrado en otras especies de plantas (Kochian y Lucas, 1982; Benlloch *et al.*, 1989; Maathuis y Sanders, 1994), sugiriendo que el modelo puede ser general en plantas (Maathuis y Sanders, 1996; Alemán *et al.*, 2011). Estos dos sistemas se pueden distinguir por el rango de concentración externa de K^+ en el que funcionan, las cinéticas, la capacidad de flujo y por la diferente sensibilidad que

presentan frente a los inhibidores (Maathuis y Sanders, 1996; Gierth y Maser, 2007; Britto y Kronzucker, 2008; Rubio *et al.*, 2008; Alemán *et al.*, 2011).

El sistema de transporte de alta afinidad (HATS) funciona a concentraciones externas bajas (por debajo de 1 mM). Este sistema se satura y se puede analizar matemáticamente utilizando el modelo de Michaelis–Menten. En las glicófitas, el valor de la K_m varía entre 13 y 130 μM , dependiendo de la especie estudiada (Maathuis y Sanders, 1996; Rubio *et al.*, 2008; Szczerba *et al.*, 2009). Por otra parte, se piensa que el transporte de K^+ por este mecanismo esta acoplado a la entrada pasiva de protones, siguiendo su gradiente de potencial electroquímico (Maathuis y Sanders, 1994; Rodríguez-Navarro, 2000). Se ha mostrado que la importancia de la incorporación de K^+ de alta afinidad es muy elevada en tejidos que contienen menos K^+ (Kochian y Lucas, 1982). Además, el transporte de K^+ de alta afinidad es sensible a NH_4^+ y se inhibe por Na^+ , especialmente a concentraciones externas en el rango milimolar (Santa-María *et al.*, 2000; Nieves-Cordones *et al.*, 2007; Shabala y Cuin, 2007; Nieves-Cordones *et al.*, 2010). Muchos estudios moleculares en glicófitas han determinado que el transporte de alta afinidad de K^+ esta dominado por la familia de transportadores KT/HAK/KUP (Fig. 1A), con una contribución menor de la familia de los transportadores HKT/Trk y CPA (Britto y Kronzucker, 2008; Szczerba *et al.*, 2009; Alemán *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha propuesto también una contribución de canales de tipo AKT (Fig. 1A), que mediarían la incorporación pasiva de K^+ desde concentraciones superiores a 0,01 mM (Hirstch *et al.*, 1998; Alemán *et al.*, 2011).

El sistema de transporte de baja afinidad (LATS) funciona a concentraciones externas altas (superiores a 1 mM), y es insensible a la presencia de K^+ (Kochian y Lucas, 1982) y NH_4^+ (Spalding *et al.*, 1999; Santa-María *et al.*, 2000). Se ha mostrado que la cinética del transporte de baja afinidad (LATS) es lineal, aunque a veces son saturantes, dependiendo de la metodología utilizada (Fu y Luan, 1998). En general, se considera que este transporte está mediado por canales, que pueden ser específicos para K^+ , canales AKT (inhibidos por Ba^{2+}), o no específicos (Fig. 1A). En cualquier caso, el transporte se produce a favor de gradiente de potencial electroquímico (Szczerba *et al.*, 2009).

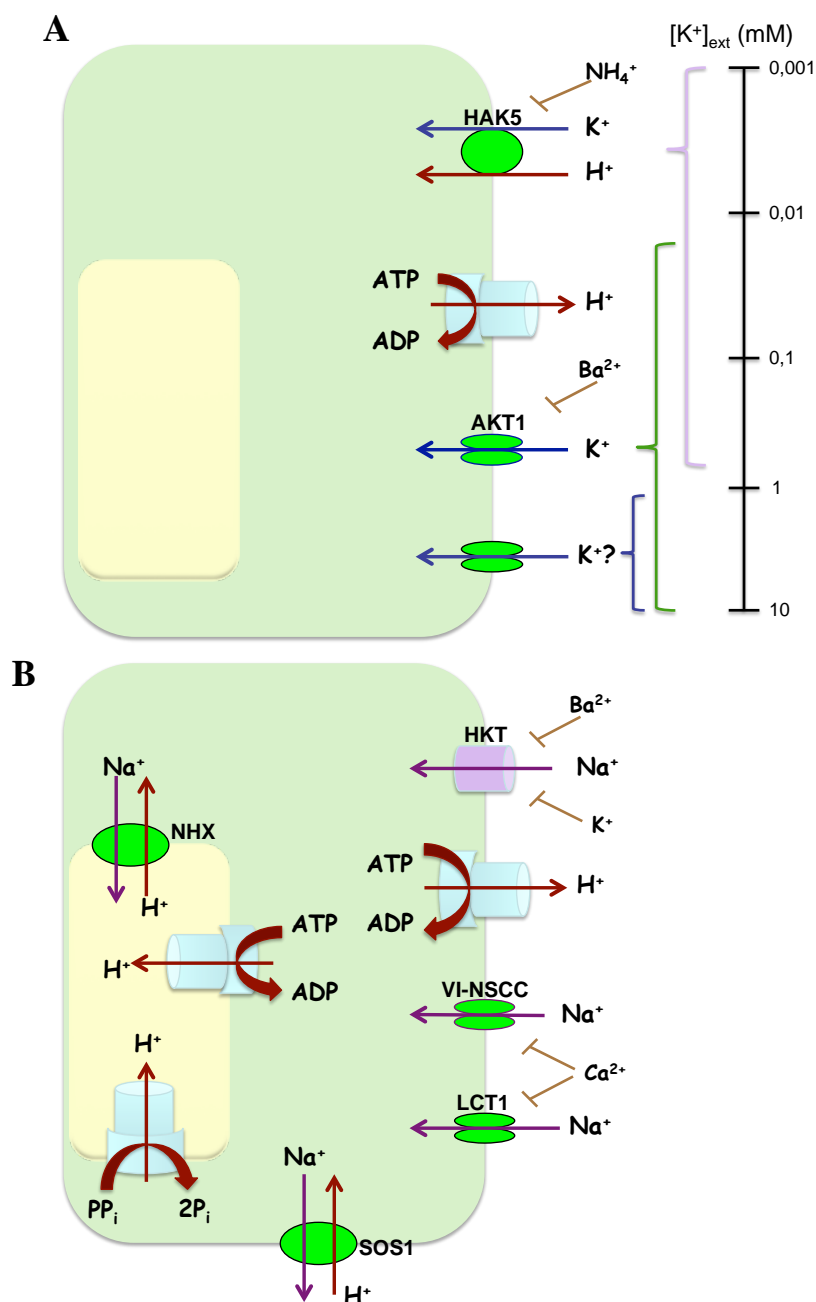


Figura 1. Sistemas de transporte implicados en el transporte de K^+ (A) y Na^+ (B) en células radicales.

- (A) Se indica el proceso de incorporación de K^+ por la raíz en *Arabidopsis thaliana* (modificado de Alemán *et al.*, 2001). El transporte de K^+ estaría mediado por transportadores dependientes de protones HAK (HAK5 en el caso de *Arabidopsis*), inhibidos por NH_4^+ , para concentraciones entre 0,001-1 mM K^+ y por canales AKT (AKT1), inhibidos por Ba^{2+} , para concentraciones mayores de 0,01 mM K^+ . Otros canales no específicos para K^+ podrían permitir la entrada de K^+ en el rango milimolar.
- (B) Se indican los principales transportadores implicados en la entrada de Na^+ al interior celular: VI-NSCC, canales catiónicos no selectivos independientes del voltaje; LCT1, transportador de cationes de baja afinidad 1, ambos inhibidos por Ca^{2+} ; transportadores de tipo HKT, inhibidos por K^+ y Ba^{2+} , mediarían el transporte de Na^+ de alta afinidad. El transportador SOS1 excluye el Na^+ del citoplasma y el NHX lo introduce en la vacuola, utilizando ambos el gradiente de H^+ generado por las bombas de protones.

Algunos estudios sobre la incorporación de K^+ en halófitas (Jefferies, 1973; Wickens y Cheeseman, 1991; Mori *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2004), han abordado algunos aspectos como la influencia del Na^+ (Mori *et al.*, 2011), o el efecto de varios inhibidores (Peng *et al.*, 2004); sin embargo, existen muy pocas publicaciones sobre las cinéticas y afinidad de este transporte (Alemán *et al.*, 2009). Por otra parte, en algunas especies de halófitas se han buscado homólogos de transportadores de K^+ conocidos en glicófitas. Así, en *Mesembryanthemum crystallinum* se han encontrado varios miembros de la familia de canales de potasio AKT/KAT, cuatro genes *HAK* y un miembro de la familia HKT (Sue *et al.*, 2001, 2002, 2003). La expresión de estos genes en los tejidos de la planta y en levadura sugirió que los genes *HAK* podían estar implicados en la incorporación de K^+ a alta salinidad en esta planta. De la misma manera, la expresión heteróloga del gen *HAK* de la halófito marina *Cymodocea nodosa* (Garcia-deblás *et al.*, 2002) también indicó la implicación de esta proteína en la incorporación de K^+ de baja afinidad en esta planta. La supuesta implicación de los genes *HAK* en la incorporación de K^+ en estas especies de halófitas contrasta con la inhibición por Na^+ de la expresión de algunos transportadores HAK observada en algunas plantas glicófitas (Nieves-Cordones *et al.*, 2010). En definitiva, aunque se ha obtenido alguna información valiosa sobre la incorporación de K^+ en halófitas desde el enfoque molecular, todavía se requiere evaluar las características funcionales del proceso de transporte de K^+ en este grupo de plantas (Flowers y Colmer, 2008).

I.2.5. Incorporación de Na^+

Como se ha comentado anteriormente, la incorporación de Na^+ es fundamental para la fisiología de las halófitas y éstas pueden mantener altas tasas de incorporación neta de este ión sin que la planta sufra daños (Flowers y Colmer, 2008). De hecho, pueden contener concentraciones de Na^+ y de Cl^- (también usado para el ajuste osmótico) superiores a 500 mM, referido a contenido de agua en el tejido (Flowers, 1985). Sin embargo, todavía no se conoce bien cómo entra el ión Na^+ en las raíces de las halófitas (Flowers y Colmer, 2008; Cheeseman, 2013), así como tampoco en glicófitas (Kronzucker y Britto, 2011).

El flujo de Na^+ al interior de la planta, que muestra valores similares a la incorporación neta de Na^+ en halófitos (Flowers y Colmer, 2008), se ha medido en

algunas especies de halófitas a concentraciones externas en el rango 25-500 mM NaCl (Jefferies, 1973; Shepherd y Bowling, 1979; Mills *et al.*, 1985; Yeo y Flowers, 1986; Lazof y Cheeseman, 1988; Shennan *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007), esto es, en el rango de baja afinidad. Sin embargo, sólo trabajos más recientes en las especies *Thellungiella halophila* (Wang *et al.*, 2006), una especie tolerante a la salinidad y próxima a *Arabidopsis*, y *Suaeda maritima* (Wang *et al.*, 2007), se han centrado en el estudio del mecanismo de transporte de Na^+ . Sin embargo, en plantas glicófitas este mecanismo se ha estudiado con mayor profundidad debido a sus implicaciones con respecto a la tolerancia a la salinidad de los cultivos. Así, se ha propuesto que varios sistemas de transporte de la membrana plasmática podrían estar involucrados en la incorporación de Na^+ de baja afinidad en glicófitas, cuando éstas se encuentran en condiciones de alta salinidad (Horie y Schroeder, 2004; Apse y Blumwald, 2007; Zhang *et al.*, 2010; Kronzucker y Britto, 2011; Maathuis, 2013; Kronzucker *et al.*, 2013). Estos sistemas de transporte podrían, por tanto, estar también implicados en el caso de la incorporación de Na^+ en halófitas. Una de las propuestas iniciales fue que los canales catiónicos no selectivos (NSCC, Fig. 1B) podrían participar en la incorporación de Na^+ de baja afinidad en glicófitas (Amtmann y Sanders, 1999); más tarde, también se sugirió que estos canales tendrían ese mismo papel en el caso de la halófito *T. halophila* (Wang *et al.*, 2006; Demidchick y Maathuis, 2007). Sin embargo, el papel de los NSCC en este proceso ha sido puesto en discusión recientemente (Kronzucker y Britto, 2011). Posteriormente se propuso la implicación del transportador de cationes de baja afinidad 1 (LCT1, Fig. 1B), aislado originalmente en trigo (Amtmann *et al.*, 2001), pero dado que dicho transportador se inhibe por Ca^{2+} , su papel en ambientes salinos, donde la concentración de Ca^{2+} es alta, se ha considerado poco probable (Zhang *et al.*, 2010). Por otro lado, también se ha propuesto que transportadores de K^+ , tales como los transportadores de tipo HAK y HKT, así como canales selectivos de K^+ (tales como AKT1) podrían estar implicados en la incorporación de Na^+ en glicófitas (Santa-María *et al.*, 1997; Garcíadeblás *et al.*, 2003; Goldack *et al.*, 2003). De entre todos estos transportadores de la membrana plasmática, sólo los transportadores de tipo HKT y los canales AKT1 se han implicado en la incorporación de Na^+ de baja afinidad en la especie halófito *Suaeda maritima* (Wang *et al.*, 2007).

En glicófitas, no sólo se ha observado un transporte de Na^+ de baja afinidad, sino que también se ha detectado una incorporación de alta afinidad. Así, algunas especies de plantas glicófitas pueden incorporar Na^+ del medio a concentraciones externas tan bajas como las que se dan en el caso de la incorporación de K^+ de alta afinidad (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Una explicación probable para la incorporación de un ion, que es tóxico en el caso de las glicófitas, es que el Na^+ es un sustituto adecuado del ión K^+ cuando la baja disponibilidad de éste restringe el crecimiento de la planta (Marschner, 1995; Subbarao *et al.*, 2003; Horie *et al.*, 2007). Este proceso podría haber sido importante en estados iniciales de la evolución de las plantas terrestres, cuando la baja disponibilidad de K^+ en el medio era frecuente (Beerbower, 1985). Este transporte de Na^+ de alta afinidad, inicialmente descrito por Rains y Epstein (1967) en cebada, fue más tarde caracterizado mediante técnicas moleculares, y se ha demostrado que es diferente del transporte de K^+ de alta afinidad presente en las plantas terrestres. Este transporte se ha descrito en el arroz, la cebada, el trigo y el girasol (Garcia-deblás *et al.*, 2003) y se demostró que era llevado a cabo por transportadores de tipo HKT en el arroz; y también parece que es así en el caso de la cebada y el trigo (Garcia-deblás *et al.*, 2003, Haro *et al.*, 2005, Horie *et al.*, 2007). El grupo de transportadores HKT, inicialmente descritos como transportadores de K^+ de alta afinidad (Schachtman y Schroeder, 1994), ha resultado finalmente ser un grupo muy complejo (Corratge-Faillie *et al.*, 2010), con diferentes familias que han sido principalmente implicadas en el transporte de Na^+ en el rango de baja o de alta afinidad (Haro *et al.*, 2010). En el arroz, la cebada y en el trigo, el transporte de Na^+ de alta afinidad mediado por HKT es inhibido por K^+ y Ba^{2+} (Fig. 1B) y se puede observar solamente cuando la planta se cultiva a una baja concentración de K^+ y Na^+ en el medio (Garcia-deblás *et al.*, 2003; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Horie *et al.*, 2007).

En un estudio más amplio sobre el transporte de Na^+ de alta afinidad, se analizaron varias especies de mono- y dicotiledóneas, así como dos plantas sin flores (una especie de musgo y otra de hepática) y, en todos los casos, se detectó la existencia de un transporte de Na^+ de alta afinidad (Haro *et al.*, 2010). Sin embargo, las características del transporte de alta afinidad en estas especies eran distintas de las del arroz, ya que ni el Ba^{2+} y ni el K^+ inhibieron el transporte de Na^+ . Se propuso entonces que otros transportadores, distintos a los HKT, podrían estar implicados en el transporte

de Na^+ de alta afinidad en estas especies (Haro *et al.*, 2010). Parece entonces que el transporte de Na^+ de alta afinidad es una característica común de las plantas terrestres desde las briófitas a las plantas con flores (Haro *et al.*, 2010). Sin embargo, los estudios de transporte de Na^+ en halófitas, como se mencionó anteriormente, se han centrado en la incorporación de Na^+ en el rango milimolar, ya que ésta es la concentración presente usualmente en el entorno de la planta. No obstante, considerando lo anterior, se plantea la cuestión de si el transporte de Na^+ de alta afinidad podría estar presente en especies halófitas, y si ese transporte sería diferente del transporte de K^+ de alta afinidad, como se ha observado en las plantas glicófitas.

I.3. *Halimione portulacoides* (L.) Aellen

Halimione (= *Atriplex*) *portulacoides* (L.) Aellen es una halófito perenne, arbustiva, que crece en las marismas alrededor de las costas de Europa, África del Norte y Sudoeste de Asia. Es la especie dominante en la parte alta de las marismas bien drenadas y a menudo bordea canales o estanques que son inundados frecuentemente en la marea alta (Chapman, 1950). Como consecuencia, *H. portulacoides* se expone a salinidades cercanas a la del agua del mar. Se ha demostrado experimentalmente que puede crecer en un rango amplio de salinidad, mostrando un índice de crecimiento máximo alrededor de 100-200 mM de NaCl, que va disminuyendo a concentraciones de NaCl mayores de 400 mM (Jensen, 1985; Redondo-Gómez *et al.*, 2007). Así, su alta productividad y su capacidad para crecer en suelos contaminados por metales pesados (Sousa *et al.*, 2008) hace de ésta una especie potencial para la recuperación de suelos salinos y para fitorremediación.

Se han estudiado varios aspectos de los mecanismos de tolerancia a la salinidad de *H. portulacoides*, como la acumulación de sal en las hojas (Jensen, 1985), y su capacidad de eliminarla a través de glándulas epidérmicas (Schirmer y Breckle, 1980; Freitas y Breckle, 1992) o la acumulación de compuestos de amonio cuaternario utilizados como osmolitos (Stewart *et al.*, 1979). Se trata, por tanto de una especie de tipo inclusor. Además, se ha analizado el efecto de la salinidad en la actividad fotosintética (Redondo-Gómez *et al.*, 2007; Benzarti *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2013), así como en los niveles de polifenoles, prolina y la actividad antioxidante de las hojas (Benzarti *et al.*, 2012). Sin embargo, no hay información disponible sobre las

características de la incorporación de K^+ y Na^+ de esta especie, que puede ser esencial para comprender el mecanismo de tolerancia a la salinidad de esta planta, ni sobre la permeabilidad relativa Na^+/K^+ de la membrana plasmática de sus células. Por otra parte, aunque se han analizado los contenidos totales de K^+ y Na^+ en plantas crecidas a distintas concentraciones de NaCl, tanto en hojas (Redondo-Gómez *et al.*, 2007, Benzarti *et al.*, 2012, Duarte *et al.*, 2013), como en raíces (Redondo-Gómez *et al.*, 2007), se desconoce cuál es la actividad citoplasmática de ambos iones y cómo varían con la salinidad. Sería por tanto de gran valor poder obtener medidas de la concentración de ambos iones y determinar así el valor de la relación K^+/Na^+ citoplasmática a distintas concentraciones de NaCl, aspecto fundamental para la tolerancia a la salinidad (Amtmann y Sanders, 1999). Además, conocer la actividad citoplasmática de K^+ y Na^+ es fundamental para saber si estos iones penetran en la célula a través de un transporte activo o pasivo. Por otra parte, el análisis de la variación de la actividad citoplasmática del ión Na^+ en presencia de inhibidores de la respiración, podría ser indicativo de la implicación de transportadores de tipo SOS1 en el mecanismo de tolerancia a la salinidad de esta especie. Este tipo de estudios puede realizarse utilizando técnicas electrofisiológicas que permiten medir no sólo el potencial de membrana, sino también la actividad citoplasmática de un ión determinado.

H. portulacoides crece, entre otras zonas del Sur de la Península Ibérica, en el estuario del río Palmones (Algeciras, Cádiz). Las raíces de las especies que habitan en la marisma de este estuario son bañadas por el agua de mar, con distinta frecuencia según su posición en la marisma, y soportan concentraciones de Na^+ y Cl^- en el agua intersticial del sedimento donde viven de entre 500-1700 mM NaCl, según la época del año (Palomo, 2004). El pH del agua intersticial es ligeramente alcalino (8,3; Rubio *et al.*, 2003), aunque presenta oscilaciones con la profundidad del sedimento (Palomo, 2004). Este agua intersticial presenta elevadas concentraciones de ciertos nutrientes, aunque bajas de algunos otros (Rubio *et al.*, 2003). Entre los nutrientes que se presentan a mayor concentración, y que, en principio, no serían limitantes para el crecimiento de las plantas, se encuentra el amonio (0,3-1,5 mM NH_4^+) y el fosfato (6-112 $\mu M P_i$). Sin embargo, la concentración de nitrato es baja (0-9 $\mu M NO_3^-$), debido a las condiciones reductoras del sedimento durante la mayor parte del año (Palomo, 2004). Por otra parte, la concentración de K^+ se sitúa entre 5 mM en la estación húmeda y 20 mM K^+ en la estación seca. Así, en invierno, la concentración de K^+ se encuentra en sus niveles más

bajos, mientras que los niveles de amonio pueden seguir siendo elevados, por encima de 1,5 mM (Palomo, 2004). Ello determina que, eventualmente, en situación de limitación de K^+ las raíces de esta especie tendrían que incorporarlo a través de sistemas de alta afinidad, es decir, a través de transportadores de K^+ dependientes de protones (Rodríguez-Navarro, 2000). Estos transportadores, como se ha indicado anteriormente, son sensibles a amonio, sin embargo los canales AKT, capaces también de incorporar K^+ en el rango micromolar (Hirsch *et al.*, 1998), no son sensibles a este ión (Santa-María *et al.*, 2000). Se plantea por tanto qué tipo de mecanismos de incorporación de K^+ estarían presentes en *H. portulacoides* y cómo se verían influidos por el amonio externo. Por otra parte, dado que la concentración de K^+ puede ser baja en el agua intersticial del sedimento, aún cuando la de Na^+ se sigue manteniendo elevada, y se sabe que éste puede inhibir el transporte de K^+ (Hasegawa *et al.*, 2000), sería importante determinar qué ocurre también con la incorporación de K^+ a concentraciones elevadas de Na^+ , dado que esta sería la situación habitual en el entorno de la planta. El análisis del transporte de K^+ puede realizarse usando técnicas electrofisiológicas, dado que el flujo de iones a través de la membrana plasmática, se refleja en variaciones del potencial de la misma. Por otra parte, el uso de inhibidores del transporte de K^+ , mencionados anteriormente, así como el efecto de otros iones, puede ayudar a determinar la contribución de uno u otro sistema de transporte en la incorporación de K^+ en *H. portulacoides*.

La incorporación de Na^+ , necesario para el ajuste osmótico, se daría por definición a través de un transporte de baja afinidad en el medio donde se desarrolla esta especie. No obstante, como se ha indicado anteriormente, existe la posibilidad de que todas las plantas terrestres muestren la capacidad de incorporar este ión a concentraciones externas en el rango micromolar, es decir, con alta afinidad, a través de un transporte con características diferentes al transporte de K^+ . Dicho estudio puede realizarse igualmente mediante electrofisiología, pero es necesario trabajar con plantas que hayan estado sometidas a deficiencia tanto de Na^+ como de K^+ , lo cual es más efectivo partiendo de plántulas obtenidas a partir de semillas. Igualmente, el estudio del transporte de K^+ en deficiencia de este ión se facilita partiendo de plántulas cultivadas en deficiencia de K^+ . Dado que se pueden obtener plántulas de *H. portulacoides* a partir de semillas con un alto porcentaje de éxito en la germinación si éstas se germinan en agua destilada (Redondo-Gómez *et al.*, 2007), la mayoría de los estudios presentados en

esta memoria se realizaron en plántulas obtenidas de semillas de *H. portulacoides* procedentes de plantas del estuario del río Palmones. Por otra parte, en todos los casos, las medidas electrofisiológicas se realizaron sobre células epidérmicas de la raíz, fundamentales en el proceso de incorporación de iones.

Analizar y comprender el papel que la incorporación de K^+ y la homeostasis citoplasmática de Na^+ y K^+ tienen en el mecanismo de tolerancia a la salinidad de *H. portulacoides*, utilizando técnicas electrofisiológicas, ha sido el objetivo principal del presente trabajo. Determinar la existencia o no de un transporte de alta afinidad para Na^+ en esta especie y su relación con el transporte de K^+ , ha constituido un objetivo adicional que, sin embargo, puede contribuir a comprender el mecanismo de transporte de Na^+ de esta especie, aspecto fundamental también en la tolerancia a la salinidad.

I.4. OBJETIVOS

1.- Estudiar las características del transporte de K^+ en células radiculares de *H. portulacoides* y la contribución de canales o transportadores en dicho proceso, determinando los parámetros cinéticos de dicho transporte y analizando el efecto de inhibidores del transporte de K^+ en plantas crecidas a salinidad creciente.

2.- Analizar y caracterizar el transporte de Na^+ en el rango micromolar en células radiculares de *H. portulacoides*, determinando sus parámetros cinéticos y el efecto de inhibidores del transporte de Na^+ y K^+ sobre dicho transporte.

3.- Analizar el proceso de homeostasis citoplasmática de Na^+ y K^+ en células radiculares de *H. portulacoides* mediante la determinación de la permeabilidad relativa de la membrana plasmática a estos iones, el índice Na^+/K^+ citoplasmático y el estudio de la variación de la concentración citoplasmática de Na^+ en plantas crecidas a distinta salinidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. Material vegetal

II.1.1. Taxonomía, morfología y distribución de *Halimione portulacoides*

Atriplex portulacoides (L.), que en este trabajo denominamos por su sinónimo *Halimione portulacoides* (L.) Aellen, es una angiosperma perteneciente a la familia *Amaranthaceae*, subfamilia *Chenopodioideae*. Es una planta arbustiva perenne, decumbente, de color plateado, que puede alcanzar hasta 1,2 m de altura. Las hojas son oblongas, opuestas y carnosas. La inflorescencia es un conjunto de flores en espigas laterales y terminales y el conjunto forma una panícula (Fig. 2). La flor es unisexual; las flores femeninas presentan dos bractéolas soldadas hasta el ápice. Las flores masculinas presentan cinco sépalos, ovalados, obtusos, pulverulentos, y un androceo con cinco estambres con anteras amarillas (Castroviejo, 1990). La planta florece entre junio y septiembre. Se conoce en el lenguaje común como salobreña, verdolaga marina, falsa verdolaga o sayón.

Esta especie es una halófito perenne de tipo C3 que es frecuente en la parte alta de las marismas y en suelos salinos, extendiéndose alrededor de las costas de Europa, de África del Norte y del sudoeste Asia. Es con frecuencia el dominante fisiognómico en las marismas bien drenadas, bordeando generalmente los canales (Chapman, 1950). Así, esta especie se desarrolla en el estuario del río Palmones (36°10'21"N, 5°20'22"W), localizado en la bahía de Algeciras (Los Barrios, Cádiz) (Fig. 3). La cuenca del río Palmones presenta una red de drenaje de carácter torrencial, con fuerte poder erosivo, constituida por numerosos afluentes (Palomo, 2004). Este estuario tiene una extensión de canal de 5,6 Km, con una anchura media de 75 m y una profundidad de 1,5 a 2 m en marea baja. Se trata de un estuario de mezcla parcial (Clavero *et al.*, 1997), dominado por las mareas, que presentan una amplitud de 0,6 a 2 m (Izquierdo, 2001) y valores de salinidad entre 27 y 35 (Clavero *et al.*, 1997), aunque recientemente se han encontrado valores que abarcan un rango más amplio, entre 15 y 37 (Ruíz-Nieto, 2014).



Figura 2. Dibujo esquemático de la planta *H. portulacoides*. a) Rama florífera; b) ápice de la inflorescencia; c) flor masculina; d) detalles de una flor femenina en diferentes estados de desarrollo; e) bractéolas fructíferas. Tomado de Castroviejo, 1990.

La vegetación de la marisma asociada al estuario es de tipo arbustivo y de carácter halófito, estando dominada por los géneros *Sarcocornia* y *Arthrocnemum*. En las zonas cercanas a los canales de agua dulce destaca *Juncus maritimus* (Palomo, 2004). También se encuentran diversas especies de gramíneas del género *Spartina*. Las especies dominantes son del género *Sarcocornia*, con dos especies *S. fruticosa* y *S. perennis*, que presenta dos subespecies, *alpini* y *perennis*. Siguiendo en importancia se encuentran *Arthrocnemum macrostachyum*, *Halimione portulacoides* y *Juncus maritimus*. La distribución de estas especies depende fundamentalmente de las condiciones de encharcamiento y de la salinidad que alcanza el suelo que, a su vez, depende de la altura con respecto al nivel del mar (Palomo 2004). En un estudio cartográfico de la vegetación de la marisma a partir de fotografías aéreas (Palomo, 2004), se observó que *H. portulacoides* aparece principalmente mezclada con *S. fruticosa*, con un recubrimiento de un 50% aproximadamente, en las zonas interiores y

menos expuestas a las pleamares. También aparece mezclada con *A. macrostachyum*, aunque con un menor recubrimiento con respecto a ésta en los niveles más altos de la marisma. Con respecto a la proximidad de los canales de marea de la parte alta, *H. portulacoides* aparece a continuación de *Juncus maritimus*, que es la especie que bordea dichos canales (Palomo, 2004).

En estudios previos realizados en la zona de muestreo de *H. portulacoides*, el pH en la superficie del sedimento, donde se anclan las raíces, se sitúa en torno a 7, pero se miden valores ligeramente más ácidos, estabilizándose en torno a 6,2 a partir de los 8 cm de profundidad (Palomo, 2004). No obstante, también se han detectado valores de hasta 8,3 en el agua intersticial del sedimento (Rubio *et al.*, 2003). La salinidad de este agua intersticial se debe principalmente a la presencia de elevadas concentraciones de Na^+ , con una concentración de 1789 mM en verano y de 504 mM en invierno (Palomo, 2004). En el caso del K^+ la concentración varía entre 5,3 mM en verano y 18,3 mM en invierno (Palomo, 2004). Respecto al NH_4^+ , la concentración varía entre 1,5 mM en verano y 0,3 mM en invierno (Palomo, 2004). En relación con la profundidad, mientras que la concentración de sodio y amonio aumenta en los primeros 20 cm, alcanzando valores próximos a 800 mM Na^+ y 1,5 mM NH_4^+ , la concentración de K^+ muestra valores similares a los registrados en superficie en invierno (Rubio *et al.*, 2003).



Figura 3. Marisma del Río Palmones (Cádiz). El núcleo urbano que aparece es la pedanía de Palmones, perteneciente al municipio de los Barrios. (Tomada de Palomo, 2004).

II.1.2. Germinación de semillas y cultivo de plántulas

En diciembre de los años 2008, 2009, 2010, 2011 y 2012 se recolectaron frutos de *H. portulacoides* que se mantuvieron en frío (6 °C) y en ambiente seco. Las semillas no se extraían del fruto hasta el momento de la germinación y permanecían viables unos 8-9 meses.

Las semillas extraídas (una de cada fruto) se desinfectaban con lejía al 10% durante 30 minutos. Se hacían dos lavados de diez minutos con agua destilada estéril y luego 5 lavados de cinco minutos. Una vez desinfectadas, se colocaban en placas de Petri sobre papel de filtro de 14 cm de diámetro impregnado con 10 ml de agua destilada. Las semillas se mantenían en un régimen de 16 horas de luz (30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad a 25°C hasta que germinaban, observándose la aparición de radículas a los dos o tres días (Fig. 4). El protocolo utilizado para la germinación es similar al descrito previamente para esta misma especie (Redondo *et al.*, 2004), aunque en este caso se utilizó una temperatura alta y constante, mientras que en el trabajo citado se aplicó una temperatura de 20°C en luz y una temperatura de 5°C en oscuridad (Redondo *et al.*, 2004).



Figura 4. Plántulas de *H.portulacoides* tras dos días en agua destilada.

Las plántulas obtenidas tras la germinación de semillas se cultivaron habitualmente en placas de Petri sobre medio semisólido. Así, tras 2 o 3 días en agua destilada y una vez germinadas las semillas, las plántulas se transferían a placas de Petri que contenían un medio de cultivo simplificado compuesto por 2 mM CaCl_2 , 0,7% (p/v) de fitoagar y sales adicionales en función del diseño experimental (ver apartado II.3). El cultivo en medio semisólido se realizó en las mismas condiciones de luz y temperatura que las descritas para la germinación (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25°C).

En experimentos de crecimiento (ver apartado II.3.3.1), las plántulas obtenidas de la germinación se cultivaron en hidroponía y se transfirieron a tubos de cristal (Sigma), soportándolas en una malla de plástico de manera que las raíces permanecían sumergidas en medio líquido mientras que la parte aérea se desarrollaba en ambiente seco (Fig. 5). En cada tubo se disponían tres plántulas y se rellenaba con 30 mL de medio Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) diluido $\frac{1}{4}$ y ajustado a pH 7,3 con KOH con una determinada concentración de NaCl (Fig. 5). Las plántulas se cultivaron a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una intensidad de luz de $30 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Figura 5. Cultivo de las plántulas obtenidas tras la germinación de semillas en hidroponía

II.2. Electrofisiología

El estudio de los procesos fisiológicos que generan flujos eléctricos a través de las membranas celulares se denomina *Electrofisiología*. Esta técnica permite la medida del potencial de membrana (E_m), insertando un electrodo de diámetro pequeño (microelectrodo simple) en el interior celular (Felle, 1981) y también de actividades iónicas intracelulares utilizando microelectrodos dobles (Ammann, 1986). En cualquier caso, para que la punta del microelectrodo atravesase la membrana plasmática sin alterar el funcionamiento de la célula, el diámetro de su punta debe ser pequeño, en torno a 0,5 μm , permitiendo que, una vez perforada la membrana, ésta se selle alrededor del microelectrodo (Fig. 6).

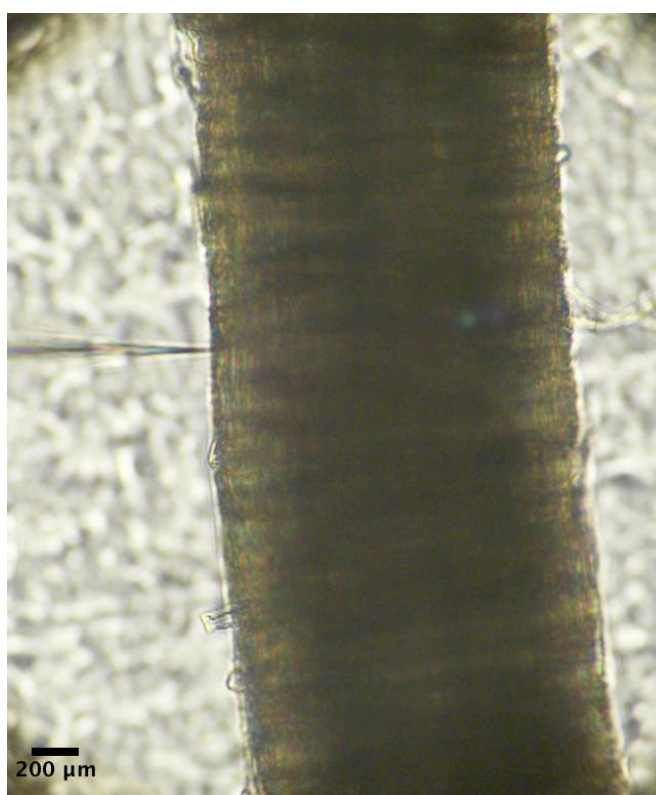


Figura 6. Microelectrodo introducido en una célula de la epidermis radicular de *H. portulacoides*.

II.2.1 Medida del potencial de membrana

La medida del E_m se obtiene midiendo la diferencia de potencial eléctrico entre un microelectrodo insertado en la célula y un electrodo de referencia situado en el medio externo. Esta medida se realizó en células radiculares de *H. portulacoides* utilizando secciones de raíces de 1,5 cm de longitud desde la zona apical. Éstas se fijaban por los extremos con parafina fundida a una cámara de perfusión, la cual presentaba un volumen útil de aproximadamente 1,1 mL.

La cámara de perfusión con la sección de la raíz fijada se colocaba en la platina de un microscopio (Leitz, Laborlux S) y se conectaba a un sistema de tubos (Fig. 7B), que permiten hacer fluir el medio de ensayo desde un matraz situado por encima del microscopio (Fig. 7A). El medio cae impulsado por gravedad, con un flujo que se mantenía constante a 10 mL/min. El exceso de medio se retiraba mediante una aguja o una pipeta Pasteur conectada a una bomba de succión (Fig. 7B). El flujo continuo de medio asegura el mantenimiento de la temperatura y de la composición de iones y de gases en el medio de ensayo. Para la aplicación de un tratamiento determinado, se accionaba una llave de paso de tres vías que permitía el cambio de medio ensayo sin alteraciones de flujo.

La medida del potencial de membrana se realizaba insertando dentro la célula de la raíz un microelectrodo (de medida) de vidrio relleno de una solución 0,5 M de KCl para permitir la conducción de la corriente eléctrica a través del mismo. Fuera de la célula se situaba el microelectrodo de referencia, o “tierra” (Felle, 1981). Éste presentaba un diámetro de punta mayor, y se rellenaba con 0.5 M KCl, solidificado con agar al 3 % (p/v).

Los microelectrodos se fabricaron a partir de capilares de vidrio de borosilicato, con un diámetro interno de $0,75 \pm 0,05$ mm y el externo de $1,5 \pm 0,05$ mm (Hilgenberg, nº1103203). Dichos capilares de vidrio contienen un filamento interno sólido de 0,2 mm de diámetro, cuya función es facilitar el llenado de los microelectrodos con la solución. Los microelectrodos se fabricaron estirando capilares de una longitud aproximada de 5 cm en un estirador (“puller”) vertical (Narishge Instruments, modelo PE-21). El “puller” consta de un filamento enrollado que rodea al capilar de vidrio en la zona donde se forma la punta del microelectrodo. La longitud y el diámetro de las puntas dependen tanto de la temperatura que alcanza el filamento, como de la duración del estiramiento. Los microelectrodos de referencia se fabricaron a partir de microelectrodos de medida usados, a los que se rompía la punta.

Para realizar las medidas del potencial de membrana los microelectrodos de medida y de referencia se colocan en portaelectrodos (o “holders”, Fig. 7B) que contienen una base de Ag-AgCl (Felle, 1981), permitiendo así el paso de la corriente desde el microelectrodo hasta una sonda conectada a un electrómetro diferencial de alta

impedancia (WPI; modelo Duo 773). Dicho electrómetro mide la diferencia de potencial eléctrico existente entre ambos microelectrodos. Esta señal se transfería a un registrador de papel (KIPP and ZONEN; modelo BD-12, Fig. 7A), obteniéndose una medida en continuo del potencial de membrana.

Todo el proceso de inserción del microelectrodo en la raíz fue realizado bajo el microscopio y mediante la acción de un micromanipulador eléctrico (Narishige, MO-109, Fig. 7A), que permite posicionar el microelectrodo a pocas micras de la célula, y un micromanipulador hidráulico de aceite (Narishige, MM-88), que permite la inserción posterior del microelectrodo en la célula. Todo el sistema, acoplado al microscopio, se monta sobre un tablero flotante, para evitar vibraciones, y dentro de una caja de Faraday, para eliminar las posibles interferencias de campos electromagnéticos (Fig. 7A).

II.2.1.1. Medida del flujo de iones mediante la medida del potencial de membrana

Puesto que tanto el ión motriz como los iones que se transportan a través de la membrana celular poseen una carga neta, cuando el balance de cargas es distinto de cero, el transporte de nutrientes a través de la membrana plasmática genera una señal eléctrica. Así, el cambio en el E_m (generalmente despolarizaciones, ΔE_m), asociado al movimiento de una cantidad de carga neta a través de la membrana como consecuencia del transporte de un ión o molécula, puede registrarse mediante la medida en continuo del E_m con un microelectrodo insertado en una célula concreta, sometida a la adición de concentraciones crecientes de un nutriente determinado. De este modo, cuanto mayor sea la cantidad de sustrato que se transporte, mayor será la señal eléctrica que se genere y, por tanto, se registrará una mayor despolarización, pudiendo alcanzar un valor máximo (D_{max}) en el caso de que el transporte se sature. Asimismo, si las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de un sustrato se ajustan al modelo de saturación de Michaelis-Menten, la V_{max} o capacidad máxima del transportador es análoga a la D_{max} (Glass *et al.*, 1992) y la constante de semisaturación (K_m) viene determinada por la concentración de sustrato que da lugar a una despolarización cuyo valor es la mitad de la D_{max} .

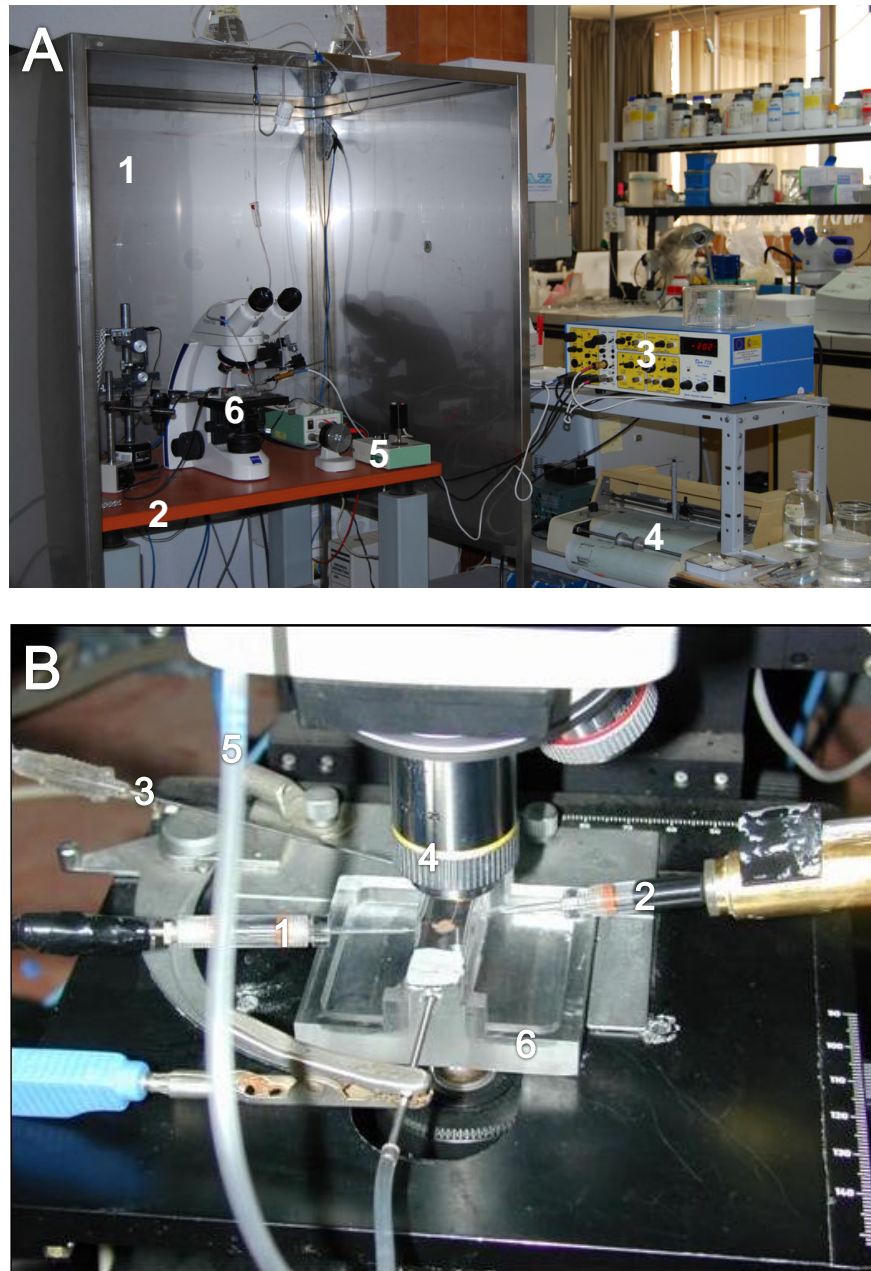


Figura 7. Componentes de un puesto de electrofisiología (A) y detalle de la cámara de perfusión y microelectrodos (B).

A. 1. Caja de Faraday; 2. Mesa antivibración; 3. Amplificador; 4. Registrador; 5. Macromanipulador; 6. Cámara de perfusión

B. 1. "Holder" y microelectrodo de referencia; 2. "Holder" y microelectrodo de medida; 3. Aguja de succión; 4. Objetivo del microscopio; 5. Tubo de entrada de medio de ensayo; 6. Cámara de perfusión

II.2.2. Medida de la actividad iónica: fabricación de microelectrodos selectivos para iones

Los microelectrodos selectivos para un ión permiten la medida de la diferencia de potencial generada por la actividad de dicho ión en presencia de otros iones (Ammann, 1986). A diferencia de otras metodologías, los microelectrodos permiten realizar una medida en continuo de la actividad intracelular de un ión en células intactas (Amtman, 1986; Felle y Bertl, 1986; Felle, 1994; Walker *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 2001; Carden *et al.*, 2003; Rubio *et al.*, 2005; Ait Hammou *et al.*, 2014). Sin embargo, para aplicar correctamente esta técnica se deben satisfacer varios requisitos (Felle y Bertl, 1986); que no se vea alterada la actividad del ión que se mide por el uso del sensor; que el compuesto selectivo (sensor) no altere el metabolismo celular; que la calibración del sensor tenga en cuenta solamente asunciones demostrables; y que el método discrimine entre compartimentos.

La medida de la actividad iónica intracelular requiere la medida simultánea del potencial de la membrana, por lo que se ha de trabajar con microelectrodos dobles. Estos microelectrodos selectivos para iones suelen fabricarse a partir de capilares dobles de vidrio de borosilicato. Una de las barras se rellena solamente con un electrolito, como en el caso de los electrodos simples (apartado II.2.1); mientras que la otra barra del capilar contiene, además del electrolito, un sensor selectivo para el ión cuya actividad se desea medir (Fig. 8). Cada una de las barras del microelectrodo doble se conecta al electrómetro y cuando el microelectrodo doble se introduce en una célula, el electrómetro registrará dos señales diferentes. Así, la barra del microelectrodo que sólo contiene el electrolito mide el E_m (señal B) y la barra que alberga el sensor mide la suma del E_m más la diferencia de potencial debida a la actividad del ión para el que es selectivo (señal A). Por tanto, la diferencia de las dos señales (A-B), que también es registrada por el electrómetro, es la diferencia de potencial eléctrico de dicho ión. Para que esta diferencia de potencial para un ión concreto pueda ser establecida, es necesario que el electrolito en contacto con el sensor contenga dicho ión. Así, según se explica en los apartados siguientes, cuando la punta del microelectrodo selectivo se introduce en una solución con una concentración determinada del ión para el que es selectivo, se transmite una señal eléctrica proporcional a la diferencia entre la actividad del ión entre

el exterior (solución) y el interior del microelectrodo, la cual puede ser calibrada frente a concentraciones externas conocidas del ión para el que el sensor es selectivo.

Los microelectrodos dobles se obtuvieron a partir de vidrio de borosilicato de doble barra cuyos diámetros externos eran de 1,5 y 0,75 mm y los internos de 0,87 y 0,35 mm respectivamente (Hilgenberg, nº 1109104). Las dos barras contienen un filamento interno sólido que permite el llenado de las mismas fácilmente. Se cortaban trozos de capilar de unos 12 cm de longitud y se fijaban en un “puller” horizontal (Narishige, modelo PD-5). Del mismo modo que el “puller” vertical, el horizontal consta de un filamento enrollado que permite calentar el capilar de vidrio hasta una temperatura predeterminada.

Una vez caliente, se giraba el capilar sobre sí mismo 180°, se estiraba lentamente y finalmente se separaba en dos partes con puntas similares. El diámetro de estas puntas depende de la temperatura alcanzada por el filamento, de la duración del estiramiento y de la fuerza con la que se produce la rotura. Una vez fabricados los microelectrodos, se cortaba la barra de menor diámetro para evitar la mezcla de los contenidos de las barras durante su llenado.

La fabricación de los microelectrodos se produce en tres pasos (Felle y Bertl, 1986; Fernández *et al.*, 1999):

Deshidratación: Después de estirar el vidrio, los microelectrodos se colocan en una estufa (P-Selecta, modelo 208) a 180 C° durante 30 - 45 minutos para deshidratarlos.

Silanización: A los microelectrodos aún calientes, se les añade unas gotas de dimetil-dicloro-silano (DDS, Fluka nº40136) disuelto en benceno al 0,1 % (v/v) y se mantienen dentro de la estufa a 180 C° durante una hora más. Tras la silanización, los microelectrodos se colocan en un cristizador con gel de sílice hasta su enfriamiento.

Llenado: La barra del microelectrodo de mayor diámetro se rellena con el sensor iónico. Para ello se procede a mezclar la resina selectiva con una solución de cloruro de polivinilo (PVC, Fluka nº 81392) disuelto en tetrahidrofurano (THF, Fluka nº 87369) al 4 % (p/v). Finalmente, los microelectrodos se colocan dentro de un cristizador con gel de sílice en posición vertical a fin de permitir que THF se evapore. Así, la resina se adsorbe a las paredes internas del vidrio y se eliminan las burbujas de aire generadas durante el llenado.

II.2.2.1. Microelectrodos de potasio: medida de actividades de K^+

Los microelectrodos selectivos para K^+ se fabricaron siguiendo el protocolo descrito por Mithöfer *et al.*, 2005, con pequeñas modificaciones (Leidi *et al.*, 2010; Ait Hammou *et al.*, 2014). La resina selectiva de K^+ se preparó a partir del cóctel comercial *Potassium Ionophore I cocktail B* (Fluka N° 60398). Se preparaba una disolución de PVC en THF, 4% (p/v) y la resina comercial se mezclaba con dicha en una proporción 30/70 (v/v) (Mithöfer *et al.*, 2005, Leidi *et al.*, 2010; Ait Hammou *et al.*, 2014).

Una vez que el THF se evaporaba, justo antes de usar el microelectrodo, se procedía con el llenado de cada una de las barras con el electrolito. La barra que contiene la resina se rellenaba con 500 mM KCl, y se insertaba en un portaelectrodos que se conectaba a la sonda A del electrómetro. Por otra parte, la barra de menor diámetro se rellenaba también con 500 mM KCl y se conectaba al canal B del electrómetro a través de un hilo de Ag clorinado en los extremos y recubierto de teflón en la zona en contacto con el aire (Fig. 8).

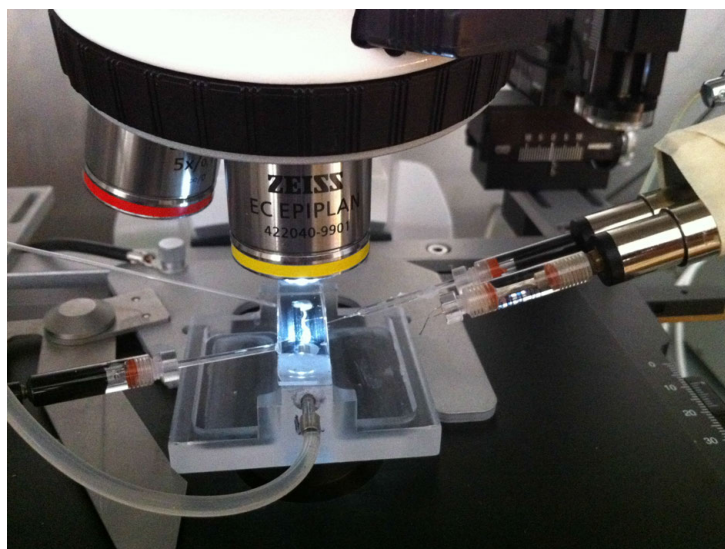


Figura 8. Microelectrodo doble conectado a las sondas A y B del electrómetro. La punta del microelectrodo doble, así como la del electrodo de referencia, localizado a la izquierda de la imagen, se sitúa en el interior de la cámara de perfusión.

Tras conectar el electrodo de referencia, la diferencia entre las dos señales (señal A - señal B) que se registra en el electrómetro corresponde a la diferencia de potencial eléctrico para K^+ . Dicha diferencia se calibraba, antes y después de utilizar los microelectrodos, con diferentes soluciones de KCl (de 1 a 500 mM), ajustadas a la misma fuerza iónica por la adición de $MgCl_2$ (Walker *et al.*, 1995). Antes de usarlos, los

microelectrodos se sumergían durante unos 30 minutos en una solución de 500 mM KCl.

La calibración se realizó mediante el ajuste a un modelo lineal de la señal emitida por la barra del microelectrodo rellena con el sensor de K^+ frente a concentraciones crecientes de K^+ . Así, la señal emitida por el microelectrodo (E) viene determinada, en mV, por el potencial de Nernst (E^N_j) para K^+ (Ecuación 1)

$$E = (RT/zF) \ln ([K^+]_e / [K^+]_i) \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde R es la constante de los gases ($8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T es la temperatura absoluta, z es la carga del K^+ (+1), F la constante de Faraday ($96,5 \text{ J mol}^{-1} \text{ mV}^{-1}$) y los subíndices “e”, “i” se refieren a la concentración de K^+ en la solución de calibración y en el electrolito (interior del microelectrodo), respectivamente. Por ser fija la concentración de K^+ del electrolito (500 mM K^+) la ecuación anterior puede reescribirse como:

$$E = E_0 - S \log [K^+]_e \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde E_0 es el potencial del electrodo cuando la $[K^+]_e = 1 \text{ M}$ y S es la pendiente en mV que corresponde al incremento en la señal eléctrica cuando la concentración de K^+ se incrementa en un orden de magnitud. La pendiente de las curvas de calibración de los microelectrodos de K^+ utilizados fue próxima a 49 mV/pK^+ .

La actividad citoplasmática de K^+ se calculó multiplicando el valor de la concentración citoplasmática obtenido por el coeficiente de actividad de K^+ (γ). Dicho coeficiente se obtuvo de la pendiente del ajuste lineal de la actividad iónica correspondiente a cada concentración de K^+ presente en las soluciones de calibración de los microelectrodos (Leidi *et al.*, 2010).

Las medidas de la actividad citoplasmática de K^+ se realizaron en células epidérmicas de la raíz, fijando la raíces en la misma cámara de perfusión y utilizando el mismo sistema descrito para la medida de E_m (apartado II.2.1).

II.2.2.1.1. Minielectrodos de K^+

Los electrodos selectivos para K^+ pueden utilizarse también para la medida de la concentración externa de dicho ión, denominándose entonces minielectrodos. La fabricación de dichos minielectrodos para uso externo es parecida a la descrita para los microelectrodos intracelulares, con algunas diferencias. Se usa vidrio simple, similar al empleado para las medidas de potencial de membrana, que se estira con un “puller” de patch-clamp (PC-10 Narishige), obteniéndose un diámetro de punta aproximado de 2 μm (Felle *et al.*, 2000). Posteriormente las barras de vidrio se deshidratan, silanizan y rellenan con el sensor de K^+ de la misma forma que se ha descrito para los microelectrodos de aplicación interna (Ait Hammou *et al.*, 2014). Una vez evaporado el THF, los minielectrodos, almacenados en ambiente seco, se rellenan con la solución de electrolito (500 mM KCl) y se conectan al canal A del electrómetro, en el mismo sistema que el usado para las medidas de potencial de membrana. La punta del minielectrodo se sumerge en una cámara de perfusión, de $\approx 0,5$ mL de volumen, en la que también se sumerge el electrodo de referencia, relleno con 0,5 M KCl solidificado con agar (0,03 %, p/v). La medida de la concentración de K^+ externa se realiza haciendo fluir soluciones a través de la cámara de perfusión a una velocidad de 1 mL min⁻¹. La señal del minielectrodo se registra en continuo, conectando el electrómetro de alta impedancia FD223a (WPI) al registrador en papel. Al igual que en el caso de los microelectrodos de uso interno, la señal de los minielectrodos de K^+ se calibraba antes y después de realizar las medidas en el mismo medio en el que se deseaba conocer la concentración de K^+ en presencia de concentraciones crecientes de este ión (de 0,1 a 10 mM KCl). En este caso, los valores de la pendiente de las curvas de calibración de los minielectrodos de uso externo fueron próximos a 42 mV/pK.

II.2.2.2. Microelectrodos de sodio: medida de actividades de Na^+

Los microelectrodos selectivos para Na^+ se fabricaron siguiendo el protocolo descrito por Fernández *et al.*, 1999 para microelectrodos selectivos para H^+ , con pequeñas modificaciones (Carden *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2005). La resina selectiva de Na^+ se preparó a partir del cóctel comercial de Fluka nº 71176, mezclado con la solución de PVC disuelto en THF (4 % p/v) en una proporción 1:6 (v/v).

Al igual que en el caso de los microelectrodos de K^+ , la mezcla formada por el cóctel para Na^+ y la solución de PVC se introducía en el interior de la barra de mayor

diámetro del microelectrodo silanizado. Se rellenaban aproximadamente 3 mm de la punta del microelectrodo, el cual se mantenía en posición vertical dentro de un cristalizador con gel de sílice; permitiendo así, tras la evaporación del THF, que la resina se adsorbiese a las paredes internas de la barra del microelectrodo, eliminándose las burbujas de aire generadas durante el llenado.

Justo antes de usar el microelectrodo, se procedía con el llenado de cada una de las barras con el electrolito. La barra que contiene la resina se rellenaba con 500 mM NaCl y se insertaba en un porta-electrodos que se conectaba a la sonda A del electrómetro. Por otra parte, la barra de menor diámetro se rellenaba con 500 mM KCl y se conectaba al canal B del electrómetro a través de un hilo de Ag clorurado en los extremos y recubierto de teflón en la zona en contacto con el aire (Fig. 8).

Tras conectar el electrodo de referencia, rellenado con 0,5 M KCl solidificado con agar (0.03% p/v), la diferencia entre las dos señales (señal A - señal B) que se registra en el electrómetro corresponde a la diferencia de potencial eléctrico para Na^+ . Dicha diferencia se calibraba, antes y después de utilizar los microelectrodos, con diferentes soluciones de NaCl en un fondo de KCl, dado que el principal ión que interfiere en la medida de Na^+ con microelectrodos de Na^+ es el K^+ (Carden *et al.*, 2001). Por tanto, para minimizar la interferencia de K^+ , se recomienda que la calibración de los microelectrodos de Na^+ se haga en presencia de concentraciones fisiológicas de K^+ (Carden *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2011). Rutinariamente se usaron soluciones de 0,1, 1, 10, 25, 50, 100 y 500 mM NaCl en presencia de 96 mM KCl (Rubio *et al.*, 2005).

Tal y como se indicó para el ión K^+ , la actividad citoplasmática de Na^+ se calculó multiplicando el valor de la concentración citoplasmática obtenido por el coeficiente de actividad de Na^+ (γ). Dicho coeficiente se obtuvo de la pendiente del ajuste lineal de la actividad iónica correspondiente a cada concentración de Na^+ presente en las soluciones de calibración de los microelectrodos (Rubio *et al.*, 2005).

La calibración, al igual que se ha descrito en el caso de los microelectrodos de K^+ , se realizó mediante el ajuste a un modelo lineal de la señal de los microelectrodos

de Na^+ en cada solución de calibración. En este caso, la pendiente de las curvas de calibración de los microelectrodos de Na^+ utilizados fue próxima a 47 mV/p Na^+ .

Las medidas de concentración citoplasmática Na^+ se desarrollaron en células epidérmicas de la raíz, fijadas en la cámara de perfusión de la misma manera que se ha descrito para la medida de E_m y concentración de K^+ (apartado II.2.1).

II.3. Diseño experimental

II.3.1. Caracterización del transporte de K^+ en *H. portulacoides*

La caracterización del transporte de K^+ se realizó en plántulas crecidas en deficiencia de dicho ión, pues, dicha deficiencia, como se ha comentado en la introducción, induce un incremento en la expresión y actividad de algunos de los transportadores implicados en la incorporación de K^+ al interior celular. Inicialmente, utilizando plántulas intactas se determinó la incorporación de este ión en raíces. No obstante, la mayor parte de la caracterización de dicho transporte se realizó mediante técnicas electrofisiológicas aplicadas a células epidérmicas de la raíz. Una caracterización cinética más extensa se llevó a cabo en plántulas crecidas en ausencia de Na^+ , es decir, en ausencia de un potencial inhibidor del transporte de K^+ , pero también se caracterizó dicho transporte en plántulas crecidas en presencia de Na^+ . Con el objetivo de poder determinar qué sistemas de transporte podrían estar implicados en el transporte de K^+ en distintas condiciones de salinidad se utilizaron distintos inhibidores del transporte de K^+ y se analizó también el efecto de diferentes iones. Finalmente, se realizaron medidas de la concentración citoplasmática de K^+ para poder calcular el gradiente de potencial electroquímico de dicho ión, y poder hacer un análisis termodinámico del transporte.

II.3.1.1. Incorporación de K^+ : experimentos de depleción en raíces

Plántulas obtenidas de la germinación de semillas de *H. portulacoides* en agua destilada, se cultivaron en 2 mM CaCl_2 , 0,7 % fitoagar durante 3 días. Las raíces se lavaron con el mismo medio de crecimiento tamponado con 1 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3 antes del experimento. Las raíces de diez plántulas (aproximadamente 0,03 g de peso fresco total de las raíces) se sumergieron en 4 ml del mismo medio suplementado con 250 μM KCl y se mantuvieron a 25°C y agitación constante (90 rpm)

durante diferentes períodos de tiempo (de 0,5 a 15 h). Una vez terminada la incubación, se congelaron las muestras de medio de ensayo. La concentración de K^+ en dicho medio se midió utilizando minielectrodos sensibles a K^+ , que se prepararon tal y como se describe en el apartado II.2.2.1.1. Las tasas de depleción de K^+ se calcularon a partir de la reducción de la concentración de K^+ en el medio de ensayo por unidad de tiempo y g de peso fresco de raíz.

II.3.1.2. Caracterización electrofisiológica del transporte de K^+ en células radiculares de plántulas crecidas en ausencia de Na^+

La caracterización del transporte de K^+ se realizó mediante la medida del potencial de membrana de células epidérmicas de raíces de plántulas crecidas en ausencia de Na^+ y de K^+ . Es decir, midiendo la magnitud de las despolarizaciones detectadas tras la adición de K^+ . Cuando las despolarizaciones obtenidas a diferentes concentraciones de K^+ (u otro ión) mostraron una cinética de saturación, los valores fueron ajustados al modelo de Michaelis-Menten (ver apartado II.2.1.1), permitiendo así, tras obtener el valor de D_{max} y K_m , caracterizar la cinética del transporte, que se denomina indistintamente también como cinética de incorporación. Además de realizar experimentos de medida del transporte de K^+ , se analizó también mediante la misma técnica el transporte de Cs^+ y Rb^+ , iones semejantes al K^+ , que pueden interferir en la incorporación de dicho ión (Rodríguez-Navarro, 2000; Very *et al.*, 1994), aspecto que también ha sido estudiado. Por otra parte, dado que se ha descrito que el Na^+ inhibe el transporte de K^+ en plantas glicófitas (Shabala y Cuin, 2007), se estudió el efecto de la presencia de dicho ión en el medio de ensayo sobre el transporte de K^+ .

Todos estos experimentos se realizaron en raíces de plántulas obtenidas tras las germinación de semillas de *H. portulacoides* en agua destilada durante 2 a 3 días y cultivadas en 2 mM de $CaCl_2$ solidificado con 0,7 % (p/v) fitoagar, durante otros 2 a 3 días. El medio de ensayo básico utilizado para la medida del potencial de membrana de las células radiculares contenía 2 mM $CaCl_2$ tamponado con 10 mM de MES-Bis Tris propano, pH 7,3. Dicho medio se modificaba en función del experimento a realizar.

II.3.1.2.1. Efecto de la adición de K^+ sobre el potencial de membrana

El medio de ensayo para la medida del potencial de membrana fue el indicado más arriba: 2 mM $CaCl_2$, 10 mM de MES-Bis Tris propano, pH 7,3. Una vez que se

conseguía una medida estable de potencial de membrana, se añadían concentraciones crecientes de K^+ al medio de ensayo (5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 y 2000 $\mu M K^+$). Dichas soluciones se preparaban añadiendo al medio de ensayo la cantidad correspondiente a partir de una solución madre de 10 mM KCl. Una vez observado y registrado el efecto de la adición de una determinada concentración de K^+ sobre el potencial de membrana, se procedía al lavado de la solución con el medio de ensayo inicial (que no contiene K^+), y se procedía a la adición de la siguiente concentración.

II.3.1.2.2. Efecto de la adición de Rb^+ y de Cs^+ sobre el potencial de membrana

Se utilizó el mismo medio de ensayo y el mismo procedimiento que en el apartado anterior (II.3.1.2.1). Las concentraciones de Rb^+ y de Cs^+ utilizadas (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 y 2000 μM), se obtuvieron a partir de una solución madre de 10 mM RbCl y 10 mM CsCl, respectivamente.

II.3.1.2.3. Efecto del Rb^+ y del Cs^+ sobre el transporte de K^+ . Cálculo de la K_i

Se utilizó el mismo medio de ensayo que en el caso anterior (2mM $CaCl_2$, 10 mM MES - Bis Tris propano, pH 7,3) al que se añadía 50, 100, 250 o 500 μM de RbCl. Para cada concentración de RbCl, se obtuvo una cinética de incorporación de K^+ añadiendo concentraciones crecientes del mismo (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 y 2000 KCl) al medio de ensayo, tal como se indicó en el apartado II.3.1.2.1. Por el mismo procedimiento se obtuvieron las cinéticas de incorporación de K^+ en medios que contenían 50, 100, 250 o 500 μM de CsCl.

Para calcular la constante de inhibición, K_i , sobre el transporte de K^+ , se debe conocer primero el tipo de inhibición del transportador responsable de la incorporación de K^+ . Para ello se analizaron las despolarizaciones obtenidas y se realizó la representación de dobles inversos de Lineweaver-Burk (Kakkar *et al.*, 1999). Así, se calculó $1/[S]$ y $1/V_0$, siendo $[S]$ la concentración del sustrato (K^+) y V_0 la velocidad, en este caso equivalente a la despolarización.

Una vez observado el tipo de inhibición, que resultó ser competitiva, se calculó la K_i con el método de la K_{mapp} aparente (Kakkar *et al.*, 1999). Una vez obtenidos los parámetros cinéticos, K_m y D_{max} (equivalente a V_{max}) para el control y para cada concentración del inhibidor (se denomina K_{mapp} , a la K_m obtenida para cada inhibidor),

se calculó el cociente K_{mapp}/V_{max} y se representó frente a la concentración del inhibidor. Se obtiene una recta, cuyo punto de corte con el eje Y es el valor de la K_i , según la ecuación que define dicha recta (ecuación 3), de modo que cuando $y = 0$, $[I] = -K_i$

$$K_{mapp}/K_m = (K_m * [I]) / (K_i * V_{max}) + (K_m / V_{max}) \quad \text{Ecuación 3}$$

K_{mapp} = constante de Michaelis-Menten aparente

I = concentración del inhibidor

K_m = constante de Michaelis y Menten (sin inhibidor)

V_{max} = Velocidad máxima

II.3.1.2.4. Efecto del Na^+ sobre el transporte de K^+

Para determinar el efecto del Na^+ sobre la incorporación de K^+ , se preparó el medio de ensayo habitual (2 mM $CaCl_2$, 10 mM MES - Bis Tris propano, pH 7,3) con distintas concentraciones de NaCl (25, 50, 100 o 300 mM NaCl). Para cada concentración de NaCl, se obtuvo una cinética de incorporación de K^+ añadiendo concentraciones crecientes del mismo al medio de ensayo (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 y 2000 KCl).

II.3.1.3. Caracterización electrofisiológica del transporte de K^+ en células radiculares de plántulas crecidas en presencia de Na^+ : efecto de la salinidad

Para conocer el posible efecto de la salinidad sobre la incorporación de K^+ se realizaron experimentos con plántulas crecidas en distintas concentraciones de NaCl. Para ello se germinaron semillas de *H. portulacoides* en agua destilada durante 2 a 3 días y se cultivaron otros 3 ó 4 días en 2 mM de $CaCl_2$, solidificado con 0,7 % de fitoagar que contenían 0, 100 ó 300 mM NaCl.

II.3.1.3.1. Efecto de la adición de K^+ sobre el potencial de membrana

El medio de ensayo utilizado para la medida del potencial de membrana fue similar al medio de crecimiento, pero tamponado con 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7.3. Una vez estabilizada la medida del potencial de membrana se añadían concentraciones crecientes de K^+ al medio de ensayo (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 y 2000 μM KCl), tal y como se indicó en el apartado II.3.1.2.1.

II.3.1.4. Efecto de distintos inhibidores e iones sobre el transporte de K^+ en plántulas crecidas a salinidad creciente

Con objeto de determinar los posibles transportadores implicados en el transporte de K^+ a distintas concentraciones de Na^+ , se analizó el efecto de varios inhibidores y de otros iones sobre el transporte de K^+ . Esta aproximación ha sido utilizada previamente en el caso de glicófitos (Rubio *et al.*, 2010). Para ello se cultivaron plántulas de *H. portulacoides* en 2 mM $CaCl_2$, 0,7% fitoagar con distintas concentraciones de NaCl (0, 100 y 300 mM NaCl), tal y como se indicó en el apartado II.3.1.3. Una vez mantenidas de 3 a 4 días en dicho medio de cultivo, se procedió a la medida del potencial de membrana en células radiculares y se analizó el efecto de dichos inhibidores/iones sobre las despolarizaciones inducidas por 1 mM K^+ , concentración saturante para dicho transporte.

II.3.1.4.1. Efecto del Cs^+ , Ba^{2+} y TEA^+

Los iones Ba^{2+} y Cs^+ inhiben el transporte de K^+ a través de la mayoría de los canales de K^+ y algunos otros transportadores, mientras que el tetraetilamonio (TEA^+) se considera un bloqueante específico de los canales de K^+ dependientes de voltaje (Hedrich y Schoreder, 1989; Tester, 1990; Hille, 1992).

A fin de conocer el efecto de estos tres inhibidores se procedió a la medida del potencial de membrana en el mismo medio de crecimiento utilizado pero tamponado con 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3. El experimento se realizaba en dos fases. Una vez la medida del E_m estaba estabilizada, se añadía 1 mM K^+ en el medio de ensayo que no contenía el inhibidor, lavando con medio sin K^+ tras observar la despolarización inducida por el mismo. En la segunda fase, se cambiaba el medio de ensayo por otro que contenía una determinada concentración del inhibidor. Se esperaba unos 30 minutos hasta que se estabilizara el potencial de membrana, y se volvía a añadir 1 mM K^+ .

Las concentraciones de inhibidores utilizadas fueron 500 μM Cs^+ (como $CsCl$), 5 mM Ba^{2+} ($BaCl_2$) y 5 mM de TEA^+ (cloruro de tetraetilamonio, Sigma - Aldrich). Como se indicó anteriormente, el efecto de estos tres inhibidores se analizó en las plántulas cultivadas a las distintas concentraciones de sodio indicadas más arriba (0, 100 y 300 mM de NaCl).

II.3.1.4.2. Efecto del pH

Con el fin de estudiar el efecto del pH sobre el transporte de K^+ , se utilizó el mismo medio de crecimiento pero tamponado con 10 mM MES-Bis Tris propano, ajustando el pH a distintos valores (5,3; 7,3 y 9,3). El experimento se iniciaba con el medio tamponado a 7,3. Una vez conseguido un valor estable del potencial de membrana, se añadía 1 mM K^+ , registrándose la despolarización inducida. A continuación se cambiaba el medio de ensayo por otro medio tamponado a pH 5,3 ó 9,3. Se esperaba un tiempo a que el potencial de membrana se estabilizase tras el cambio de pH y se volvía a añadir la misma concentración de K^+ . El efecto del pH se analizó en plántulas crecidas a las distintas concentraciones de sodio indicadas más arriba (0, 100 y 300 mM NaCl), utilizando los medios correspondientes.

II.3.1.4.3. Efecto del NH_4^+

Se ha demostrado en estudios previos que el amonio inhibe a los transportadores de K^+ de tipo HAK (Santa-María *et al.*, 2000; Bañuelos *et al.*, 2002; Martínez-Cordero *et al.*, 2004; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Así, para averiguar si este transportador de K^+ pudiera estar implicado en el transporte de dicho ión, se procedió al cultivo de plántulas en presencia o ausencia de amonio, pero también en presencia de otra fuente de nitrógeno, es decir, nitrato.

En experimentos previos donde solo se añadía amonio al medio de crecimiento, se observaba que la presencia de dicho nutriente hacía disminuir mucho el potencial de membrana. No obstante, con la presencia el nitrato en el medio de crecimiento, se obtuvieron potenciales de membrana similares tanto en plantas crecidas en presencia como en ausencia de amonio.

Tras la germinación en agua destilada, las plántulas se cultivaron durante 3 a 4 días en 2 mM $Ca(NO_3)_2$, condición control, o en el mismo medio con 1 mM NH_4Cl . Además, se cultivaron plantas en este mismo medio pero con 300 mM NaCl. Las medidas del potencial de membrana se realizaron en el mismo medio de crecimiento pero tamponado con 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3. En este caso, se realizaron cinéticas de incorporación de K^+ para cada una de las condiciones de crecimiento indicadas, según se indicó en el apartado II.3.1.2.

II.3.1.5. Medida de la actividad citoplasmática de K^+ . Cálculo del gradiente de potencial electroquímico para K^+

Las medidas de la actividad citoplasmática de K^+ (K_c^+) se realizaron en células epidérmicas de la raíz de plántulas obtenidas tras la germinación de semillas y cultivadas en ausencia o presencia de Na^+ (300 mM NaCl). El medio de ensayo utilizado para las medidas fue el mismo que se ha descrito para las medidas de potencial de membrana, es decir, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM MES-Bis Tris propano (pH 7.3) sin o con Na^+ (300 mM NaCl).

El gradiente de potencial electroquímico, o fuerza ión-motriz, para un ión "j", en mV, viene determinado por la diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de Nernst para el ión multiplicada por la carga del ión (Ecuación 4),

$$\Delta\mu/F = z (E_m - E_j^N) \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde $\Delta\mu/F$ es el gradiente de potencial electroquímico expresado en mV, siendo F la constante de Faraday, z la carga del ión, E_m el potencial de membrana y E_j^N el potencial de Nernst para el ión "j".

Si el gradiente de potencial electroquímico para un ión toma valores positivos la entrada de dicho ión debe implicar un consumo de energía; en cambio, si el gradiente de potencial electroquímico toma valores negativos, el ión puede entrar en la célula de manera pasiva, impulsado por su propia fuerza ión-motriz.

II.3.2. Caracterización del transporte de Na^+ en *H. portulacoides*

Se sabe que la incorporación de sodio de alta afinidad en glicófitos se detecta sólo cuando el medio de cultivo carece tanto de Na^+ como de K^+ (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Haro *et al.*, 2010). Por ello, la caracterización de este transporte se realizó siempre en plántulas germinadas en ausencia de dichos iones. Por otra parte, estudios previos sobre este transporte en distintas especies se han realizado habitualmente en medio de cultivo y ensayo ligeramente ácido (Haro *et al.*, 2010), de modo que, en este caso, los medios de ensayo se tamponaron a pH 6.

II.3.2.1. Incorporación de Na^+ : experimentos de depleción en raíces

Plántulas obtenidas de la germinación de semillas de *H. portulacoides* en agua destilada, se cultivaron en 2 mM CaCl_2 , 0,7 % fitoagar, durante 3 días. Las raíces se lavaron con el mismo medio de crecimiento tamponado con 1 mM MES-Bis Tris-propano, pH 6 antes del experimento. Las raíces de diez plántulas (aproximadamente 0,03 g de Peso fresco total de las raíces) se sumergieron en 4 ml del mismo medio suplementado con 500 μM NaCl y se mantuvieron a 25°C y agitación constante (90 rpm) durante diferentes períodos de tiempo (de 0,5 a 15 h). Una vez terminada la incubación, se congelaron las muestras de medio de ensayo y su concentración de Na^+ se determinó con un espectrofotómetro de absorción atómica (AANALYST 800) en los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Málaga. La tasa de depleción de Na^+ se calculó a partir de la reducción de la concentración de Na^+ en el medio de ensayo por g de peso fresco de raíz.

II.3.2.2. Caracterización electrofisiológica del transporte de Na^+ en células radiculares

II.3.2.2.1. Efecto de la adición de Na^+ sobre el potencial de membrana

Se germinaron semillas de *H. portulacoides* en agua destilada durante 2 a 3 días y se cultivaron en 2 mM de CaCl_2 , 0,7 % fitoagar, durante otros 2 a 3 días. Para realizar las medidas de potencial de membrana se utilizó el mismo medio de cultivo pero tamponado a pH 6 (2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 6).

Una vez conseguido un valor estable de potencial de membrana, se añadían secuencialmente al medio de ensayo concentraciones crecientes de NaCl (10, 20, 50, 200, 500, 1000, 2000 μM NaCl), con un paso previo de lavado con medio de ensayo sin Na^+ entre cada concentración.

II.3.2.3. Efecto de distintos inhibidores e iones sobre el transporte de Na^+

Al objeto de caracterizar el transporte de Na^+ , se realizaron en primer lugar experimentos para determinar si dicho transporte podía distinguirse del transporte de K^+ . Para ello se analizó el efecto del Rb^+ , Cs^+ y Ba^{2+} , que son inhibidores conocidos del transporte de K^+ , sobre las despolarizaciones inducidas por Na^+ . Además, se sabe que el Ba^{2+} inhibe el transporte de Na^+ de alta afinidad en algunas especies de glicófitas

(Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Dado que, en este caso, los experimentos se hacían a pH 6, para poder comparar estrictamente el efecto de dichos inhibidores, se analizó al mismo tiempo el efecto sobre las despolarizaciones inducidas por K^+ . La concentración de Na^+ y K^+ utilizada en estos experimentos (500 μM) fue menor a la saturante para ambos iones, para permanecer así más próximos al rango micromolar.

Por otra parte, para caracterizar aún más el transporte de Na^+ , se analizó el efecto del Li^+ , un análogo del Na^+ e inhibidor competitivo del transporte del mismo (Serrano *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). También se estudió el efecto del Ca^{2+} , que es inhibidor de ciertos canales NSCC (Demidchik y Maathuis, 2007) y LCT1 (Amtmann *et al.*, 2001), posibles vías de entrada del Na^+ a la célula. Por otra parte, también se analizó el efecto del pH. Finalmente, dado que el transporte de alta afinidad de Na^+ es dependiente de la presencia/ausencia de Na^+ y K^+ en el medio de cultivo, también se analizó si la presencia de estos iones afectaba a las despolarizaciones inducidas por Na^+ .

II.3.2.3.1. Efecto del Rb^+ , Cs^+ y Ba^{2+}

Las plántulas se cultivaron en las mismas condiciones de cultivo mencionadas en el apartado II.3.2.2.1. Al objeto de conocer el efecto de estos tres inhibidores sobre las despolarizaciones inducidas por Na^+ y K^+ , se procedió a la medida del potencial de membrana en 2 mM $CaCl_2$, 10 mM de MES-Bis Tris propano, pH 6. El experimento se realizaba en dos fases. Una vez la medida del E_m estaba estabilizada, se añadía 500 μM Na^+ ó 500 μM K^+ al medio de ensayo, lavando con medio sin estos iones, tras observar la despolarización. En la segunda fase, se cambiaba el medio de ensayo por otro que contenía una determinada concentración del inhibidor. Se esperaba unos 30 minutos hasta que se estabilizara el potencial de membrana, y se volvían a añadir 500 μM Na^+ ó 500 μM K^+ , registrándose la despolarización inducida. Las concentraciones de inhibidores utilizadas fueron 500 μM Rb^+ , 500 μM Cs^+ y 5 mM Ba^{2+} . Todos se suministraron en forma de sal de cloruro.

II.3.2.3.2. Efecto del pH

Las plántulas se cultivaron como en el apartado anterior y para las medidas del potencial de membrana se prepararon medios de ensayo que contenían 2 mM de $CaCl_2$, 10 mM de MES-Bis Tris propano ajustados a pH 5, 6 ó 9. Para la realización de los

experimentos se procedió de manera similar a la indicada en el apartado II.3.1.4.2, pero registrándose la despolarización inducida por 500 μM Na^+ .

II.3.2.3.3. Efecto del Li^+ y del Ca^{2+}

Las plántulas se cultivaron en las mismas condiciones de cultivo mencionadas en el apartado II.3.2.2.1. Para conocer el efecto del Li^+ sobre las despolarizaciones inducidas por Na^+ , se procedió a la medida del potencial de membrana en 2 mM CaCl_2 , 10 mM de MES-Bis Tris propano, pH 6. Una vez la medida del E_m estaba estabilizada, se añadía 500 μM Na^+ en el medio de ensayo, lavando con el medio inicial, tras observar la despolarización. Después se cambiaba el medio de ensayo inicial por otro que contenía además 500 μM LiCl , y se volvían a añadir 500 μM Na^+ , registrándose la despolarización inducida.

Para determinar el efecto del Ca^{2+} , se procedió de manera similar pero en este caso, en la segunda fase del experimento, el medio de ensayo inicial era sustituido por otro que contenía 10 mM CaCl_2 en vez de 2 mM CaCl_2 .

II.3.2.3.4. Efecto de la presencia de Na^+ y K^+ en el medio de cultivo

Para efectivamente determinar si la presencia de Na^+ y K^+ influía en la incorporación de Na^+ , se cultivaron plántulas de *H. portulacoides* en presencia de cada uno de estos iones. Tras la germinación en agua destilada, las plántulas se mantuvieron durante 4 días en un medio que contenía 2mM CaCl_2 más 500 μM NaCl o más 500 μM KCl .

Con estas plántulas se realizaron experimentos de incorporación de Na^+ , tal y como se indicó en el apartado II.3.2.2.1 en el medio de ensayo habitual, 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 6.

Además se determinó si la presencia de K^+ en el medio de ensayo interfería o no en la incorporación de Na^+ . Así, se analizó el efecto sobre la despolarización inducida por 500 μM Na^+ en presencia y ausencia de 200 μM K^+ en el medio de ensayo, siguiendo el mismo procedimiento indicado en el apartado II.3.2.3.1.

II.3.2.4. Medida de la actividad citoplasmática de Na^+ . Cálculo del gradiente de potencial electroquímico para Na^+

Para poder determinar el gradiente de potencial electroquímico, se procedió a la medida de la actividad citoplasmática de Na^+ (Na_c^+) en las mismas condiciones en las que se realizó la caracterización del transporte de Na^+ . Así, las medidas con microelectrodos dobles sensibles a Na^+ se realizaron en células radiculares de plántulas obtenidas tras la germinación de semillas en agua destilada y cultivadas de 3 a 5 días en ausencia de Na^+ y K^+ (2 mM CaCl_2 , 0.7% (p/v) fitoagar. El medio de ensayo utilizado para las medidas fue el mismo que se ha descrito para el caso de las cinéticas de incorporación de Na^+ , es decir, 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano, excepto que se tamponó a pH 7.3. Para el cálculo del valor del gradiente de potencial electroquímico, se procedió de la misma manera indicada para el caso del K^+ (ver apartado II.3.1.5)

II.3.3. Homeostasis de Na^+ en *H. portulacoides*

En el estudio de los mecanismos de tolerancia a la salinidad es fundamental conocer cuál es la concentración de Na^+ citoplasmática, y cómo esta varía o no en función de la concentración externa de Na^+ en el medio. Así, además de realizar medidas puntuales en plantas cultivadas en ausencia de Na^+ para determinar el gradiente de potencial electroquímico para este ión, también se procedió a su medida en plántulas cultivadas en presencia de Na^+ . Con estas medidas y con las del ión K^+ , mencionadas anteriormente, se pudo calcular el índice K^+/Na^+ , fundamental también para entender la tolerancia a la salinidad. Además de estas medidas puntuales, se hicieron medidas en continuo de la concentración citoplasmática de Na^+ a distintas concentraciones externas de este ión y aplicando inhibidores de la respiración. Por otra parte, se determinó la permeabilidad relativa Na^+/K^+ de la membrana plasmática de las células radiculares de plántulas crecidas con y sin Na^+ . Previamente, se realizó un estudio sobre el efecto de la salinidad en el crecimiento de plántulas y determinándose el contenido total de Na^+ y K^+ en los tejidos.

II.3.3.1 Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de plántulas

Se tomaron seis plántulas con un tamaño de raíz de ≈ 1 cm y se colocaron en tubos Sigma que contenían 30 ml de medio Hoagland diluido $\frac{1}{4}$ y tamponado a pH 7,3,

a los cuales se añadieron distintas concentraciones de Na^+ (0, 75, 150 y 300 mM NaCl). Las plántulas se sostenían dentro el tubo con ayuda de mallas de plástico esterilizadas.

Se determinó el crecimiento de la raíz y del hipocótilo por separado. Para ello se hizo una medida de la longitud del hipocótilo y de la raíz al principio del experimento y, tras 7 días de tratamiento, y se calculó el incremento relativo de la longitud.

II.3.3.2 Determinación de los contenidos totales de K^+ y Na^+ en tejidos de plántulas crecidas en ausencia y presencia de Na^+

La determinación del contenido total de K^+ y Na^+ se realizó por espectrometría de absorción atómica, que consiste en la cuantificación de la absorción por los elementos K^+ y Na^+ después de atomizar las muestras, de la radiación emitida, de 589 nm para Na^+ y 776,5 nm para K^+ . Para alcanzar el estado atómico de los elementos se sometieron las muestras a un tratamiento térmico gracias a un equipo de absorción atómico modelo AANALYST 800, que convierte sus componentes en átomos o iones elementales gaseosos.

Las medidas se realizaron en plántulas de *H. portulacoides* obtenidas tras germinar semillas en placas de Petri con agua destilada y crecidas en cultivo hidropónico, tal y como se indicó en el apartado anterior (II.3.3.1) en ausencia o en presencia de 300 mM de NaCl durante 7 días. Se prepararon muestras desecadas de cotiledones, raíces y del hipocótilo a partir de muestras de peso fresco entre 0,05 – 0,5 g. Se separó cada parte de las plántulas y se incubaron en una estufa a 110 C° durante 24 horas a fin de eliminar el contenido de agua.

II.3.3.3 Determinación de la permeabilidad relativa de Na^+ con respecto al K^+ ($\text{P}_{\text{Na}^+}/\text{P}_{\text{K}^+}$) en ausencia y presencia de Na^+

La permeabilidad relativa de la membrana se estimó basándose a la ecuación de Goldman (ecuación 5):

$$E_D = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\text{K}^+}[\text{K}^+]_e + P_{\text{Na}^+}[\text{Na}^+]_e + P_{\text{Cl}^-}[\text{Cl}^-]_i}{P_{\text{K}^+}[\text{K}^+]_i + P_{\text{Na}^+}[\text{Na}^+]_i + P_{\text{Cl}^-}[\text{Cl}^-]_e} \quad (\text{Ecuación 5})$$

E_D	Potencial de difusión
R	Constante de los gases
T	Temperatura en K°
F	Constante de Faraday
P_{K^+} , P_{Na^+} , P_{Cl^-}	Permeabilidades de la membrana para los iones: K^+ , Na^+ y Cl^-
$[]_e$ y $[]_i$	Concentraciones externa y interna de los iones

Así, para determinar la permeabilidad relativa de Na^+ con respecto a K^+ , P_{Na^+}/P_{K^+} , se debe saber el valor del potencial de difusión (E_D) en presencia de diferentes concentraciones de Na^+ y K^+ en el medio de ensayo (Fernández *et al.*, 1999). Estas medidas se realizaron en plántulas procedentes de la germinación de semillas en agua destilada durante 3 días y cultivadas durante 3 a 4 días en 2 mM $CaCl_2$, 1 mM KCl, 0,7 % fitoagar o en 2 mM $CaCl_2$, 1mM KCl, 300 mM NaCl, 0,7% fitoagar.

Las medidas se realizaron insertando microelectrodos simples en células epidérmicas de la raíz en un medio que contenía 2 mM $CaCl_2$, 1 mM KCl, 1 mM NaCl y ajustado a pH 7,3 con 10 mM MES-Bis Tris propano. Alcanzado un valor estable de E_m , se añadían al medio 0,1 mM NaCN ó 0,1 mM KCN, inhibidor de la respiración, y 0,1 mM ácido salicílico hidroxámico (SHAM), inhibidor de la respiración resistente a cianuro (Laties, 1982), con objeto de impedir la síntesis de ATP. De este modo se despolarizaba la membrana hasta alcanzar el valor de E_D por desactivación de la H^+ -ATPasa (Fernández *et al.*, 1999). Para determinar la permeabilidad de la membrana citoplasmática al Na^+ , se añadieron concentraciones crecientes de este ión (1, 5, 10, 25 y 50 mM NaCl), determinándose el valor del potencial de difusión para cada concentración. Para determinar la permeabilidad al K^+ , se añadieron 5, 10, 25 y 50 mM KCl, registrándose igualmente la variación del potencial de difusión.

La adición de los dos inhibidores se hizo a partir de disoluciones concentradas de 0,2 M NaCN, 0,1 M KCN y 1 M SHAM. No obstante, la solución concentrada de NaCN o de KCN se preparó en agua destilada, mientras que la de SHAM se preparó en 2-metoxietanol ($C_3H_8O_2$, Fluka N°: 64720).

II.3.3.4. Efecto de la concentración externa de Na^+ sobre la actividad citoplasmática de este ión en plántulas crecidas con o sin Na^+ .

Se realizaron medidas en plántulas cultivadas en ausencia o en presencia de 300 mM NaCl. Así, en el caso de las plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ se midió, en continuo, el efecto sobre la actividad citoplasmática de Na^+ del incremento de la concentración externa de este ión, añadiendo secuencialmente 1, 10 y 60 mM NaCl al medio de ensayo (2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7.3). Finalmente, en presencia de 60 mM NaCl se añadía al medio de ensayo un cóctel inhibitorio de la respiración (0.1 mM NaCN/SHAM). En el caso de las plantas cultivadas en presencia de 300 mM NaCl, las medidas de Na^+_c se realizaron, en continuo, disminuyendo la concentración de NaCl del medio de ensayo (2 mM CaCl_2 , 300 mM NaCl, 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7.3) hasta 100 mM NaCl en presencia de 335 mM sorbitol para mantener la osmolaridad del medio. Asimismo, también se midió el efecto sobre el Na^+_c de la adición 0.1 mM NaCN/SHAM al medio de ensayo que contenía 300 mM NaCl.

II.4. Tratamiento de los datos

Los datos obtenidos se representaron gráficamente con el programa informático *Kaleida graph 3.08* (Synergy software), que se utilizó también para la realización de ajustes lineales y para los ajustes al modelo de Michaelis-Menten. Se consideraron válidos los ajustes cuyo coeficiente de determinación (R^2) era superior a 0,95. El error que aporta el programa junto a los parámetros del ajuste a la ecuación corresponden al error del ajuste.

Los datos se representan como la media \pm desviación estándar (SD) o error estándar de la media (SE) de al menos 3 réplicas independientes. Los datos se analizaron mediante test de comparación de medias (prueba t de Student) o análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test a posteriori (test de Tukey) considerando un nivel de significación (α) de 0,05 en todos los casos. Todos los análisis se realizaron usando el programa STATGRAPHICS Centurion v. XVI (Statpoint Technologies, Inc.).

RESULTADOS

III.1. Caracterización del transporte de K^+ en *H. portulacoides*

III.1.1. Incorporación de K^+ en raíces

Las raíces de plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ y K^+ son capaces de incorporar K^+ del medio externo cuando éste se encuentra a concentraciones en el rango micromolar. Esto se demostró en experimentos de depleción donde raíces intactas se pusieron en contacto con una concentración inicial de $250 \mu M K^+$, observándose una disminución progresiva de la concentración externa de K^+ (Fig. 9), y alcanzándose un valor de alrededor de $50 \mu M K^+$ tras 15 h de incubación. La tasa inicial de incorporación de K^+ se calculó en las primeras cuatro horas dando un valor de $4,27 \pm 1,7 \mu mol K^+ g^{-1} PF_{raíz} h^{-1}$.

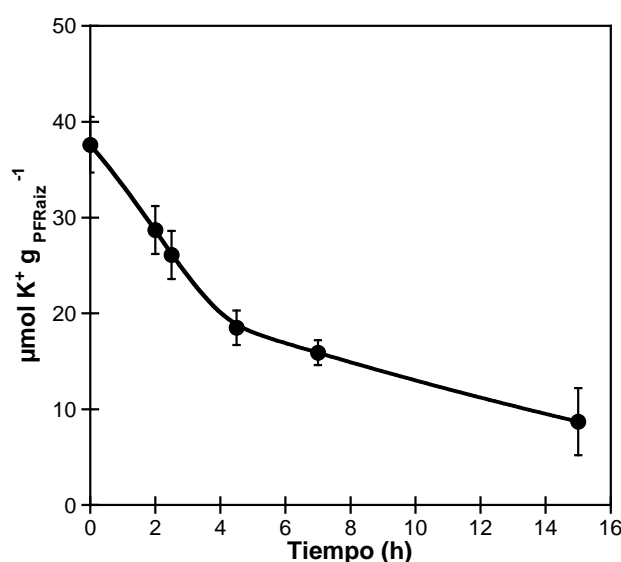


Figura 9. Incorporación de K^+ en raíces de *H. portulacoides*. Las raíces de plántulas completas cultivadas en deficiencia de K^+ y Na^+ se sumergieron en una solución 2 mM $CaCl_2$, 10 mM MES-Bis Tris propano (pH 7,3). A tiempo 0, se añadió K^+ al medio a una concentración de $250 \mu M KCl$. Las plántulas se incubaron a diferentes tiempos y la concentración de K^+ en el medio se analizó con minielectrodos selectivos para K^+ . Los datos se representan como la media \pm SE (n=3)

III.1.2. Transporte de K^+ en células radiculares de plántulas crecidas en ausencia de Na^+

III.1.2.1. Cinética de incorporación de K^+ en células de la raíz

Para caracterizar el transporte de K^+ en estas plantas, se midieron los potenciales de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ y K^+ y se analizó el efecto de la adición de K^+ (rango $5-2000 \mu M K^+$) sobre el

potencial de membrana. Se realizaron experimentos con plántulas obtenidas por germinación de semillas y cultivadas durante 2-4 días en 2 mM de CaCl_2 , 0,7 % fitoagar. El medio de ensayo contenía 2 mM de CaCl_2 , tamponado a pH 7,3 con 10 mM MES-Bis Tris propano al que se añadió concentraciones crecientes de KCl.

Las células radiculares mostraron un potencial de membrana con un valor medio entorno a -200 mV ($E_m = -204 \pm 12$ mV, $n = 20$). La adición de concentraciones micromolares de K^+ indujo despolarizaciones rápidas, que fueron mayores al aumentar las concentraciones de K^+ (Fig. 10).

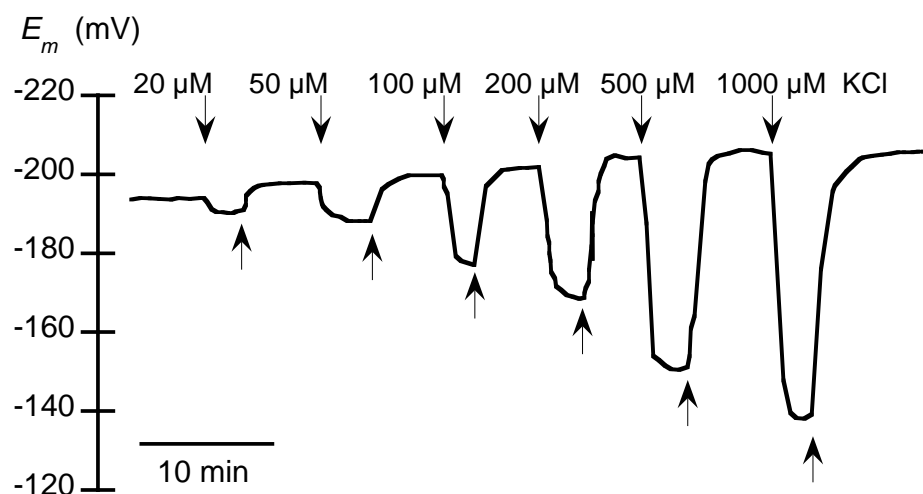


Figura 10. Despolarizaciones de la membrana inducidas por concentraciones crecientes de K^+ . Las medidas de E_m se realizaron en raíces de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ . El medio de ensayo contenía 2mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano pH 7.3. Las flechas superiores muestran el momento en el que se añadía KCl al medio y las flechas inferiores muestran el momento en el que se retiraba.

Las despolarizaciones de membrana, que son una estimación del transporte de iones, mostraron una cinética de saturación y los valores se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten (Fig. 11). Tras el ajuste de los datos se obtuvo una despolarización máxima (D_{max}) de alrededor de 80 mV (79 ± 1 mV) y una constante de semisaturación (K_m) de alrededor de 300 μM K^+ (296 ± 4 μM K^+). Estos datos y su ajuste se consideraron como el tratamiento control en la caracterización del transporte de K^+ .

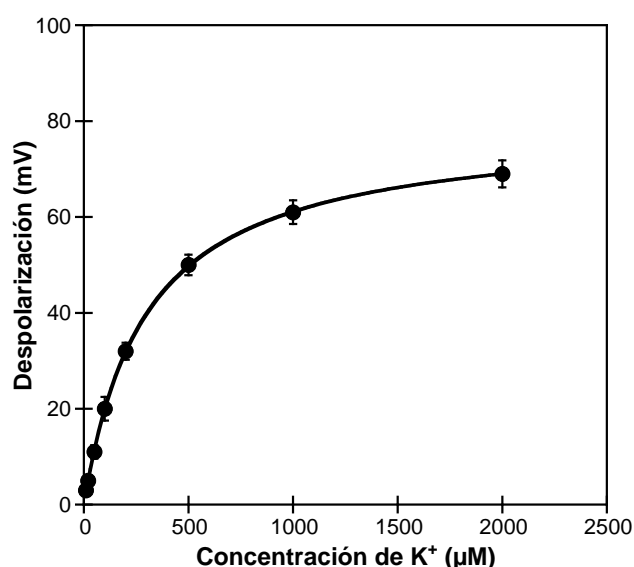


Figura 11. Despolarizaciones de la membrana inducidas por K⁺ en células de la raíz de *H. portulacoides*. Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K⁺ y Na⁺ en un medio que contenía 2 mM CaCl₂, 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3 y se añadieron concentraciones crecientes de K⁺ como KCl. Los valores de las despolarizaciones se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten y los parámetros cinéticos se indican en el texto. Los datos representan la media \pm SE de al menos 3 réplicas.

III.1.2.1.1. Cinéticas de incorporación de Rb⁺ y de Cs⁺

Como paso previo para analizar el efecto del Rb⁺ y del Cs⁺ sobre el transporte de K⁺, se determinó la incorporación de dichos iones por electrofisiología, siguiendo el mismo protocolo que en el caso de K⁺, pero en este caso utilizando RbCl o CsCl.

La adición de Rb⁺ dio lugar a despolarizaciones de la membrana, como se ha descrito anteriormente para el ión K⁺, pero las despolarizaciones fueron menores que las inducidas por K⁺ (Fig. 12). La magnitud de las despolarizaciones mostró una cinética de saturación respecto a la concentración de Rb⁺ añadida, ajustándose los valores al modelo de Michaelis-Menten. El valor de la despolarización máxima inducida por Rb⁺ fue la mitad de la generada por K⁺ (39 ± 3 mV), y el valor de K_m fue cercano al doble del observado para K⁺ (488 ± 112 μM Rb⁺).

El ión Cs⁺ también produjo despolarizaciones de membrana, pero de magnitud mucho más pequeña, de 5 mV como mucho, indicando que este catión no es transportado tan eficientemente como el K⁺ y el Rb⁺.

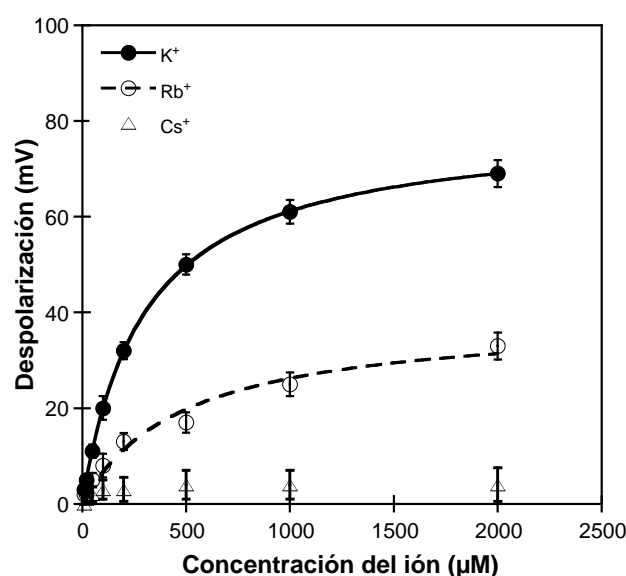


Figura 12. Despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ , Rb^+ y Cs^+ en células de la raíz de *H. portulacoides*. Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ en un medio que contenía 2 mM $CaCl_2$, 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3. Concentraciones crecientes de K^+ (círculos negros), Rb^+ (círculos blancos) o Cs^+ (triángulos) se añadieron al medio de ensayo en forma de sal de cloruro. Los valores de las despolarizaciones fueron luego ajustados al modelo de Michaelis-Menten, excepto en el caso del Cs^+ , y los parámetros cinéticos se indican en el texto. Los datos se representan como la media \pm SE de al menos 3 réplicas.

III.1.2.2. Efecto del Rb^+ y del Cs^+ sobre el transporte de K^+

III.1.2.2.1. Cinéticas de incorporación de K^+ en presencia de Rb^+

Para analizar el efecto del ión Rb^+ sobre la incorporación de K^+ , se obtuvieron cinéticas de incorporación de K^+ en diferentes medios de ensayo que contenían diferentes concentraciones de Rb^+ (0, 50, 100 ó 250 μ M Rb^+).

Las despolarizaciones inducidas por K^+ , medidas en presencia de diferentes concentraciones de Rb^+ , se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten (Fig. 13) y los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la Tabla 1. El valor del potencial de membrana (E_m) no varió significativamente entre los distintos tratamientos (Tabla 1).

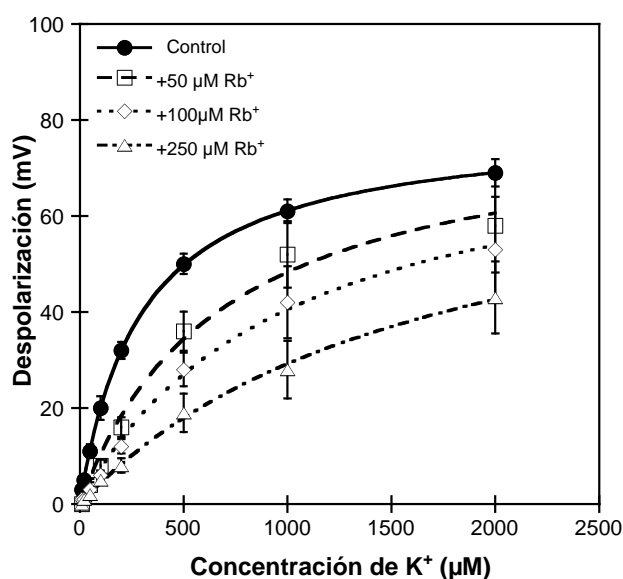


Figura 13. Efecto del ión Rb^+ sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ . Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ en un medio que contenía 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3, en presencia de diferentes concentraciones de RbCl : 0 (círculos), 50 μM (cuadrados), 100 μM (diamantes) y 250 μM (triángulos). Los valores de las despolarizaciones, inducidas por el aumento de las concentraciones de K^+ en presencia de cada concentración de Rb^+ , se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 1. Los datos corresponden a la media \pm SE de al menos 3 réplicas.

La adición de Rb^+ en el rango de 50-250 μM no alteró los valores de D_{\max} , pero produjo un aumento en la constante de semisaturación K_m , que se duplicó en presencia de una concentración de tan sólo 50 μM Rb^+ (Fig. 13, Tabla 1). Ello es indicativo de un proceso de inhibición que se analiza el siguiente apartado.

Tabla 1. Efecto del Rb^+ sobre la cinética de incorporación de K^+ . Los valores de la despolarización máxima (D_{\max}) y de la constante de semisaturación (K_m) fueron obtenidos ajustando los valores de las despolarizaciones de la membrana (Fig. 13) al modelo de Michaelis-Menten. Se indican también los valores medios del potencial de membrana (E_m). Los datos de potencial de membrana corresponden a la media \pm SD. Los valores de potencial de membrana en presencia de Rb^+ no fueron significativamente distintos al valor observado en la situación control (ANOVA, $P > 0,05$).

Rb^+ (μM)	D_{\max} (mV)	K_m (μM)	E_m (mV)
0	79 ± 1	296 ± 4	-204 ± 9 (n=8)
50	81 ± 6	683 ± 124	-204 ± 15 (n=6)
100	80 ± 4	994 ± 113	-205 ± 24 (n=4)
250	78 ± 5	1701 ± 187	-197 ± 11 (n=4)

III.1.2.2.1.1. Tipo de inhibición. Cálculo de la K_i

La variación de K_m observada en la Tabla 1 es una característica de la inhibición competitiva, y ello fue corroborado por representaciones de dobles inversos de Lineweaver-Burk (Fig. 14). Así, se calculó el inverso de los valores de las despolarizaciones medias ($1/\Delta E_m$) inducidas por concentraciones crecientes de K^+ en presencia de las distintas concentraciones de Rb^+ y se representó frente al inverso de la concentración de K^+ (Fig. 14). La representación gráfica indicó la existencia de una inhibición de tipo competitivo.

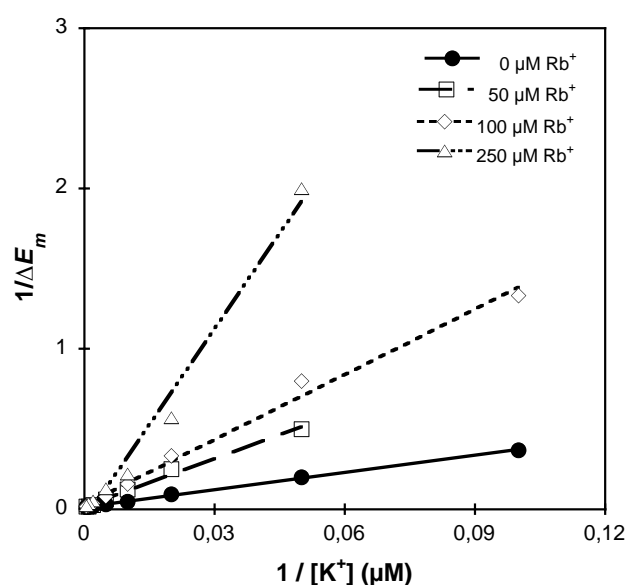


Figura 14. Representación de Lineweaver-Burk del efecto de la presencia de Rb^+ . Representación de dobles inversos de las despolarizaciones medias obtenidas a distintas concentraciones de sustrato (K^+) en presencia de diferentes concentraciones de $RbCl$: 0 (círculos), 50 μM (cuadrados), 100 μM (diamantes) y 250 μM (triángulos).

La constante de inhibición (K_i) del Rb^+ se calculó por el método " $K_{m, app}$ " mediante la representación del cociente K_{mapp} / V_{max} frente a la concentración del inhibidor (Kakkar *et al.*, 1999). Dicha representación aparece en la Figura 15, de modo que cuando $y=0$, $[I]=-K_i$. El valor obtenido fue de 65 $\mu M Rb^+$.

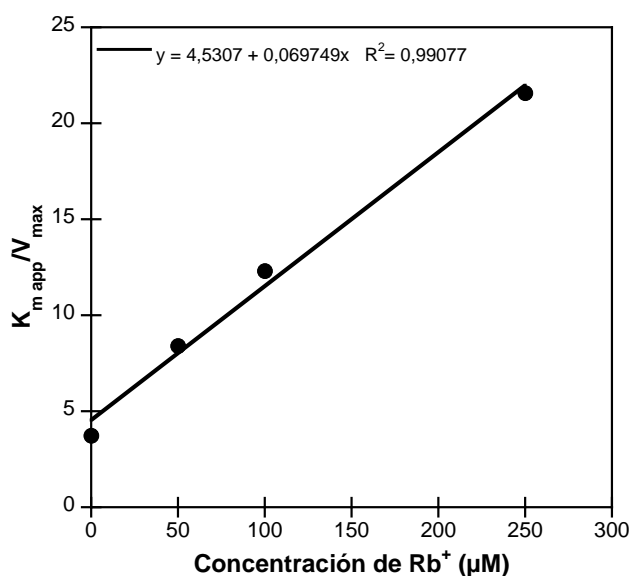


Figura 15. Representación de K_{mapp}/V_{max} frente a concentración del inhibidor (Rb^+). Los datos de K_{mapp} y V_{max} se obtuvieron tras el ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten (Tabla 1) y se justaron a un modelo lineal.

III.1.2.2.2. Cinética de incorporación de K^+ en presencia de Cs^+

Como en el caso del Rb^+ , se analizó el efecto del ión Cs^+ sobre la incorporación de K^+ . De manera similar, se obtuvieron cinéticas de incorporación de K^+ en diferentes medios de ensayo que contenían diferentes concentraciones de cesio (0, 50, 100, 250 μM Cs^+).

Las despolarizaciones inducidas por K^+ obtenidas a diferentes concentraciones de Cs^+ se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten (Fig. 16) y los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la Tabla 2. El valor del potencial de membrana (E_m) no mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Tabla 2).

A diferencia del Rb^+ , la presencia de 50 ó 100 μM de Cs^+ en el medio externo no afectó a la cinética de incorporación de K^+ , y las D_{max} y K_m fueron similares al control (Fig. 16, Tabla 2). Sólo la adición de 250 μM Cs^+ causó una disminución en el valor de la despolarización máxima. Así, aunque parece que el ión Cs^+ no es transportado por las células de la raíz (como se ha indicado en el apartado III.1.2.1.1), este ión puede bloquear el transporte de K^+ a concentraciones superiores a 250 μM .

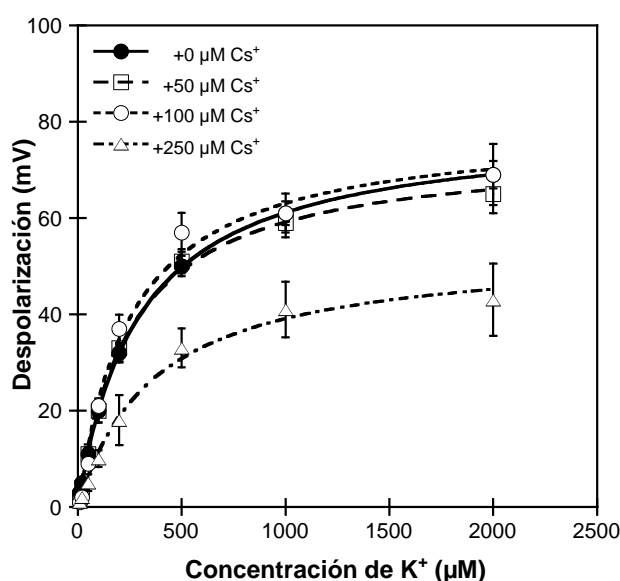


Figura 16. Efecto del ión Cs^+ sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ . Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ en un medio que contenía 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3, en presencia de diferentes concentraciones de CsCl : 0 (círculos negros), 50 μM (cuadrados), 100 μM (círculos blancos) y 250 μM (triángulos). Los valores de las despolarizaciones, inducidas por el aumento de las concentraciones de K^+ en presencia de cada concentración de Cs^+ , se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 2. Los datos corresponden a la media \pm SE de al menos 3 réplicas.

Tabla 2. Efecto del Cs^+ sobre la cinética de incorporación de K^+ . Los valores de despolarización máxima (D_{\max}) y la constante de semisaturación (K_m) fueron obtenidos ajustando los valores de las despolarizaciones de la membrana (Figura 16) al modelo Michaelis-Menten. Se indican también los valores medios \pm SD del potencial de membrana (E_m), que fueron similares entre los tratamientos (ANOVA, $P > 0,05$).

Cs^+ (μM)	D_{\max} (mV)	K_m (μM)	E_m (mV)
0	79 ± 1	296 ± 4	-204 ± 9 (n=8)
50	74 ± 1	258 ± 16	-196 ± 17 (n=4)
100	79 ± 4	255 ± 41	-208 ± 3 (n=3)
250	53 ± 2	368 ± 52	-203 ± 14 (n=3)

III.1.2.3. Efecto del Na^+ sobre el transporte de K^+

Para evaluar el efecto del Na^+ en el transporte de K^+ , se registraron las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de K^+ , en el medio de ensayo base, con distintas concentraciones externas de Na^+ (25-300 mM Na^+). Los valores obtenidos se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten (Fig. 17, Tabla 3).

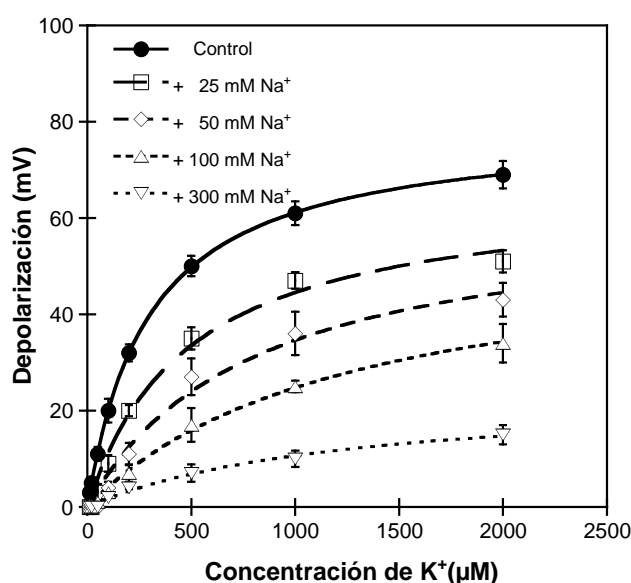


Figura 17. Efecto del ión Na^+ sobre las despolarizaciones de la membrana inducidas por K^+ . Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ en un medio que contenía 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3, en presencia de diferentes concentraciones de NaCl: 0 (círculos), 25 μM (cuadrados), 50 μM (diamantes), 100 μM (triángulos) y 300 μM (triángulos invertidos). Los valores de las despolarizaciones inducidas por el aumento de las concentraciones de K^+ en presencia de distintas concentraciones de Na^+ , se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 3. Los datos representan la media \pm SE de al menos 3 réplicas.

En primer lugar, la D_{\max} disminuyó ligeramente, entre el 15-30%, en presencia de hasta 100 mM Na^+ mientras la K_m aumentó progresivamente, estando por encima de 1 mM K^+ a 100 mM Na^+ . En segundo lugar, la presencia de Na^+ no tuvo un efecto claro sobre el potencial de membrana de las células en este rango de concentración, aunque se encontraron diferencias significativas a 50 mM Na^+ (Tabla 3). Por el contrario, cuando las células fueron expuestas a una concentración externa de 300 mM Na^+ , el potencial de membrana mostró valores más positivos, variando de -200 mV a -150 mV aproximadamente (Tabla 3). Los valores de la K_m aumentaron ligeramente a aproximadamente 1,5 mM K^+ y las despolarizaciones inducidas por K^+ disminuyeron considerablemente (Tabla 3, Fig. 17). Así, los valores D_{\max} se redujeron en un 70 % en comparación con las condiciones control (sin Na^+). Por lo tanto, la presencia de concentraciones milimolares Na^+ induce una disminución en la afinidad por K^+ y una disminución progresiva de la D_{\max} , que indicaría una inhibición de tipo acompetitivo. No obstante, se observa un efecto mucho mayor sobre la D_{\max} cuando la concentración externa alcanza 300 mM Na^+ , condición en la que el E_m está despolarizado.

Tabla 3. Efecto de la presencia de concentraciones milimolares de Na^+ sobre la cinética de transporte de K^+ . La despolarización máxima (D_{\max}) y la constante de semisaturación (K_m) fueron obtenidas ajustando los datos de la Figura 17 al modelo de Michaelis-Menten. Se indican también los valores medios \pm SD del potencial de membrana (E_m) a cada concentración de Na^+ . Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Tukey; $P < 0.05$).

Na^+ (mM)	D_{\max} (mV)	K_m (μM)	E_m (mV)
0	79 ± 1	296 ± 4	-204 ± 9 (n=8) ^a
25	66 ± 5	488 ± 90	-188 ± 7 (n=3) ^{ab}
50	62 ± 7	804 ± 213	-183 ± 5 (n=3) ^b
100	56 ± 4	1260 ± 185	-197 ± 10 (n=3) ^{ab}
300	25 ± 3	1429 ± 316	-146 ± 10 (n=3) ^c

III.1.3. Transporte de K^+ en células radiculares de plántulas crecidas en presencia de Na^+ : efecto de la salinidad.

Para evaluar la influencia de la salinidad sobre la incorporación de K^+ , se cultivaron plantas a diferentes concentraciones de Na^+ , y se analizó el transporte K^+ a las mismas concentraciones externas de Na^+ que se utilizaron para el crecimiento. Como se observó anteriormente en plantas crecidas en ausencia de Na^+ (control), concentraciones micromolares de K^+ también dieron lugar a despolarizaciones de la membrana en las plantas cultivadas en 100 ó 300 mM Na^+ (Fig. 18).

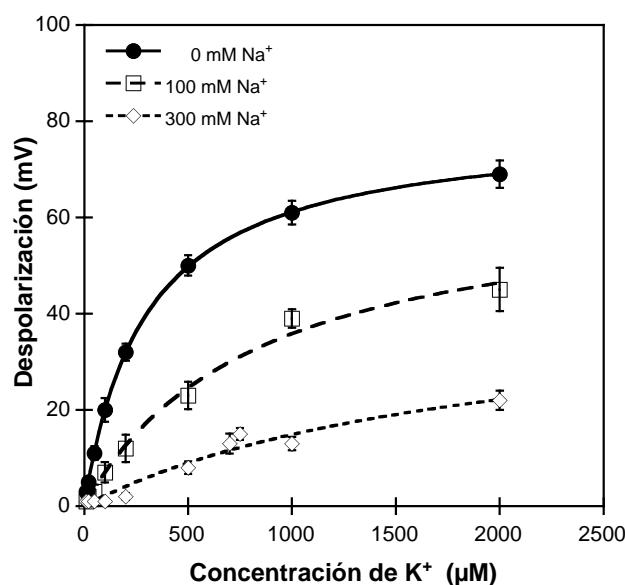


Figura 18. Despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ en plantas cultivadas a diferentes concentraciones de Na^+ . Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de las raíces de plántulas crecidas en ayuno de K^+ y presencia de 0 (círculos), 100 mM (cuadrados) o 300 mM de NaCl (diamantes) en un medio que contenía 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3 y la misma concentración de Na^+ utilizada para el crecimiento. Los valores de las despolarizaciones inducidas por la adición de concentraciones crecientes de K^+ al medio de ensayo, se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 4. Los datos representan la media \pm SE de al menos 5 repeticiones.

Los valores de las despolarizaciones se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten y los parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 4. Se puede observar que la despolarización máxima (D_{max}) así como la afinidad por K^+ disminuyeron al aumentar la concentración de Na^+ en el medio de crecimiento.

Tabla 4. Efecto de las concentraciones de Na^+ usadas en el crecimiento sobre la cinética de transporte de K^+ . Los valores de las despolarizaciones de la Fig. 18 se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten, estimándose la despolarización máxima (D_{max}) y la constante de semisaturación (K_m). Se incluyen los valores medios \pm SD del potencial de membrana (E_m) en cada tratamiento; diferentes letras indican diferencias significativas (test de Tukey, $P < 0,05$).

$[Na^+](mM)$ Crecimiento	D_{max} (mV)	$K_m(\mu M)$	E_m (mV)
0	79 ± 1	296 ± 4	-204 ± 9 (n=8) ^a
100	66 ± 5	840 ± 136	-191 ± 11 (n=7) ^{ab}
300	43 ± 11	1925 ± 772	-186 ± 13 (n=5) ^b

Los potenciales de membrana no cambiaron significativamente a 100 mM Na^+ con respecto al control, sin embargo, cuando las plantas se cultivaron en medio con una mayor salinidad (300 mM Na^+), los potenciales de membrana mostraron valores más positivos, con diferencias en torno a 20 mV (Tabla 4). Sin embargo, la variación en el potencial de membrana fue menor que la encontrada en las plantas cultivadas en ausencia de Na^+ y sometidas a 300 mM Na^+ en el medio de ensayo (sobre 60 mV, Tabla 3). Es decir, cuando las plantas se cultivan durante varios días en 300 mM Na^+ , las células de la raíz son capaces de mantener un potencial de membrana muy negativo (Tabla 4). Por otro lado, aunque la D_{max} disminuyó en este tratamiento, la disminución fue menor (alrededor de 50 %) que la encontrada en las plantas cultivadas en ausencia de Na^+ y sometidas a 300 mM Na^+ (sobre un 70%).

III.1.4. Efecto de distintos inhibidores e iones sobre el transporte de K^+ en plántulas cultivadas a salinidad creciente

Dado que se observaron diferencias en el transporte de K^+ a distintas salinidades, se continuó con la caracterización del mismo analizando el efecto de diferentes inhibidores e iones sobre el transporte de K^+ . Así, se analizó el efecto de dichos inhibidores sobre la despolarización inducida por 1 mM K^+ en plantas crecidas en 0, 100 y 300 mM NaCl.

III.1.4.1. Efecto del Cs^+

La adición de 1 mM de KCl al medio de ensayo (2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3) provocó una despolarización media en torno a 55 mV en células radiculares de plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ (Fig. 19). Posteriormente, al cambiar el medio de ensayo a un medio de la misma composición pero con 500 μM CsCl, la adición de 1 mM de KCl dio lugar a una despolarización media en torno a 16 mV que resultó ser significativamente distinta a la control (Fig. 19). Es decir, se detectó una inhibición del transporte de K^+ del 71 %.

En los experimentos realizados de manera similar, pero en medios de ensayo que contenían de 100 ó 300 mM de NaCl, se observó el mismo efecto sobre el transporte de K^+ , de modo que se observaron diferencias significativas entre las despolarizaciones control y las obtenidas en presencia de Cs^+ (Fig. 19). La inhibición en presencia de 100 mM Na^+ fue del 77 % y en el caso de 300 mM Na^+ , la inhibición fue del 67 %.

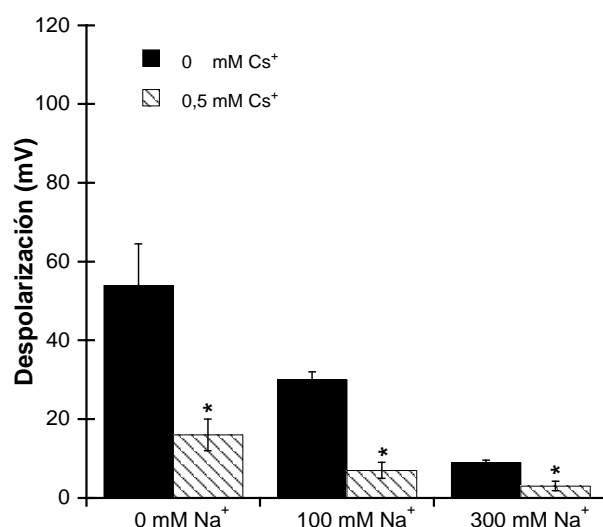


Figura 19. Efecto del Cs^+ sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ en plantas cultivadas a diferentes concentraciones de Na^+ . Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y en presencia de 0, 100 y 300 mM NaCl en un medio que contenía 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3, más la misma concentración de Na^+ utilizada para el crecimiento. Una vez estabilizado el potencial de membrana, se añadió 1 mM de KCl al medio y las despolarizaciones se registraron en ausencia (barras negras) o en presencia de 500 μM de CsCl (barras rayadas). Los datos representan la media \pm SE de al menos 3 repeticiones. Las despolarizaciones en presencia de Cs^+ se compararon con el valor control a cada concentración de Na^+ . Valores significativamente distintos de cada control se indican con un asterisco (t de Student, $P < 0,05$).

La adición de 500 μM Cs^+ no alteró de manera significativa el E_m de las células epidérmicas en ninguno de los tratamientos, no observándose diferencias significativas

entre el potencial de membrana medido en ausencia (control) y tras la adición de cesio en los medios con diferente concentración de Na^+ (Tabla 5).

Tabla 5. Potenciales de membrana (E_m , en mV) de células radiculares en ausencia (control) y en presencia de $500 \mu\text{M Cs}^+$ en medios con diferente concentración de Na^+ . Estos potenciales se midieron antes de la adición de 1 mM KCl , en las mismas condiciones y medios de ensayo indicados en la Fig. 19. No se observaron diferencias significativas entre los valores en ausencia o en presencia de $500 \mu\text{M Cs}^+$ en cada condición de Na^+ (t de Student, $P > 0,05$ en cada caso).

Na^+ (mM)	E_m (mV) Control	E_m (mV), + $500 \mu\text{M Cs}^+$
0	-196 ± 4 (n=4)	-201 ± 14 (n=4)
100 mM	-183 ± 2 (n=4)	-182 ± 10 (n=4)
300 mM	-182 ± 11 (n=3)	-179 ± 6 (n=3)

III.1.4.2. Efecto del TEA^+

En experimentos realizados de manera similar al apartado anterior, la adición del inhibidor al medio de ensayo, en este caso 5 mM TEA^+ , no afectó a las despolarizaciones inducidas por 1 mM K^+ en todas las condiciones crecimiento analizadas (Fig. 20).

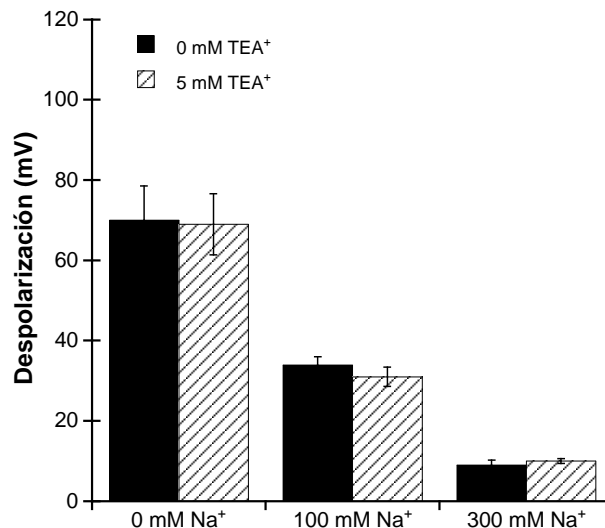


Figura 20. Efecto del TEA^+ sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ en plantas cultivadas a diferentes concentraciones de Na^+ . Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y en presencia de 0, 100 y 300 mM NaCl en un medio que contenía 2 mM CaCl_2 , $10 \text{ mM MES-Bis Tris propano}$, pH 7,3, más la misma concentración de Na^+ utilizada para el crecimiento. Una vez estabilizado el potencial de membrana, se añadió 1 mM KCl al medio y las despolarizaciones se registraron en ausencia (barras negras) o en presencia de 5 mM TEA^+ (barras rayadas). Los datos se representan como medias \pm SE de al menos 3 repeticiones. Las despolarizaciones en presencia de TEA^+ se compararon con el valor control a cada concentración de Na^+ mediante una t de Student ($P > 0,05$ en todos los casos).

La presencia de TEA⁺ (5 mM) en los medios de ensayo que contenían diferente concentración de Na⁺ tampoco alteró de manera significativa el potencial de membrana E_m de las células epidérmicas de la raíz de *H. portulacoides* (Tabla 6).

Tabla 6. Potenciales de membrana (E_m , en mV) de células radiculares en ausencia (control) y en presencia de 5 mM TEA⁺. Estos potenciales se midieron antes de la adición de 1 mM KCl, en las mismas condiciones y medios de ensayo indicados en la Fig. 20. Los valores corresponden a la media \pm SD de al menos 3 réplicas. No se observaron diferencias significativas entre los valores del potencial de membrana medidos en ausencia o en presencia de TEA⁺ en ninguno de los tratamientos de Na⁺ (t de Student, $P > 0,05$, en todos los casos).

Na ⁺ (mM)	E_m (mV) Control	E_m (mV), + 5 mM TEA ⁺
0	206 \pm 21	-205 \pm 18 (n=5)
100 mM	-196 \pm 9	-192 \pm 8 (n=6)
300 mM	-184 \pm 16	-168 \pm 17 (n=3)

III.1.4.3. Efecto del Ba²⁺

La adición de 5 mM Ba²⁺ al medio de ensayo inhibió casi por completo la despolarización inducida por 1 mM de K⁺ en todos los tratamientos (Fig. 21). En concreto la inhibición fue del 93 %, 91% y 100% en los tratamientos de 0, 100 y 300 mM NaCl, respectivamente.

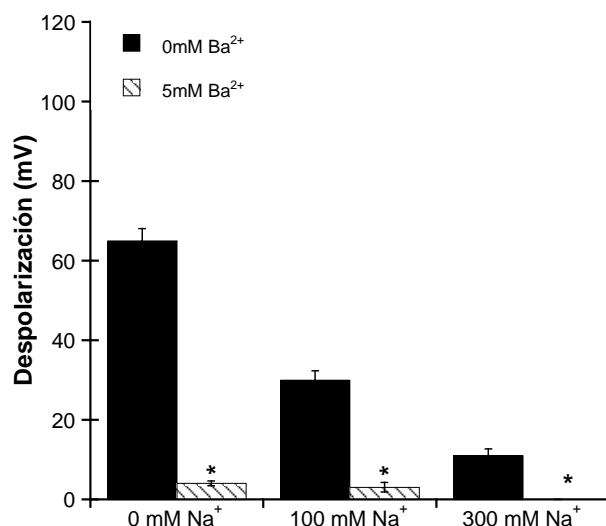


Figura 21. Efecto del Ba²⁺ sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por K⁺ en plantas cultivadas a diferentes concentraciones de Na⁺. Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K⁺ y en presencia de 0, 100 y 300 mM NaCl en un medio que contenía 2 mM CaCl₂, 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3, más la misma concentración de Na⁺ utilizada para el crecimiento. Una vez estabilizado el potencial de membrana, se añadió 1 mM de KCl al medio y las despolarizaciones se registraron en ausencia (barras negras) o en presencia de 500 μ M de BaCl₂ (barras rayadas). Los datos representan la media \pm SE de al menos 3 repeticiones. Las despolarizaciones en presencia de Ba²⁺ se compararon con el valor control a cada concentración de Na⁺. Valores significativamente distintos respecto a cada control se indican con un asterisco (t de Student, $P < 0.05$).

Por otra parte, la presencia de Ba^{2+} no alteró de manera significativa el E_m de las células epidérmicas de la raíz de *H. portulacoides* respecto a los valores medidos en ausencia de bario en cada tratamiento de Na^+ (Tabla 7).

Tabla 7. Potenciales de membrana (E_m , en mV) de células radiculares en ausencia (control) y en presencia de 5 mM Ba^{2+} . Estos potenciales se midieron antes de la adición de 1 mM KCl, en las mismas condiciones y medios de ensayo indicados en la Fig. 21. Los valores corresponden a la media \pm SD de 3 réplicas. No se observaron diferencias significativas entre los valores del potencial de membrana medidos en ausencia o en presencia de Ba^{2+} en ninguno de los tratamientos de Na^+ (t de Student, $P > 0,05$, en todos los casos).

Na^+ (mM) Crecimiento	E_m (mV) Control	E_m (mV), + 5 mM Ba^{2+}
0	-192 ± 10	-189 ± 9 (n=3)
100 mM	-189 ± 13	-187 ± 9 (n=3)
300 mM	-167 ± 2	-165 ± 4 (n=3)

Para comparar el efecto de los tres inhibidores en las tres condiciones de cultivo, los valores de despolarización en presencia de cada inhibidor se expresaron como porcentaje respecto al control (de cada inhibidor) y los datos se compararon mediante un ANOVA (Fig. 22). Como se puede observar, el efecto de todos los inhibidores fue el mismo independientemente de la concentración de Na^+ usada para el crecimiento, es decir, el TEA^+ no afectó al transporte de K^+ , el Cs^+ indujo una inhibición del transporte en torno a un 70% y el Ba^{2+} produjo una inhibición más drástica, siempre por encima del 90%.

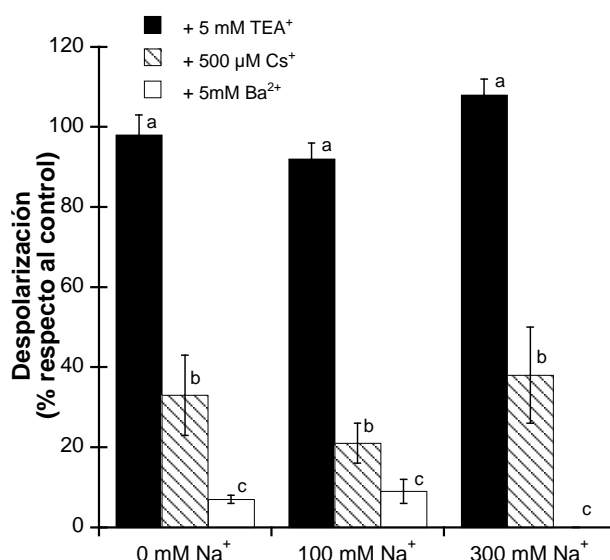


Figura 22. Efecto de distintos inhibidores sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por 1 mM K^+ en plantas cultivadas a diferentes concentraciones de Na^+ . Los datos de las Figs. 19, 20 y 21 se expresaron como porcentajes. Para cada inhibidor y tratamiento de crecimiento, los valores de las despolarizaciones en ausencia del inhibidor se consideraron como 100%. Los datos se representan como la media \pm SE de al menos 3 repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey, $P < 0,05$).

III.1.4.5. Efecto del pH sobre el transporte de K^+

El pH externo puede afectar a la actividad de los transportadores de membrana dependientes de protones y, por tanto, a los transportadores de tipo HAK, que se supone que funcionan asociados a este ión motriz (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). En todos los casos, para comprobar el efecto del pH sobre el transporte de K^+ , se registraron las despolarizaciones inducidas por 1 mM de K^+ en un medio que contenía 2 mM $CaCl_2$, 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3, más la concentración de NaCl usada para el crecimiento de las plántulas, y posteriormente se cambiaba a un medio similar pero tamponado a pH 5,3 ó 9,3, se esperaba la estabilización del potencial de membrana y de nuevo se analizaba el efecto de la adición de K^+ .

No obstante, la variación del pH del medio de ensayo no tuvo ningún efecto sobre el transporte de K^+ en ninguna de las condiciones de cultivo (Fig. 23).

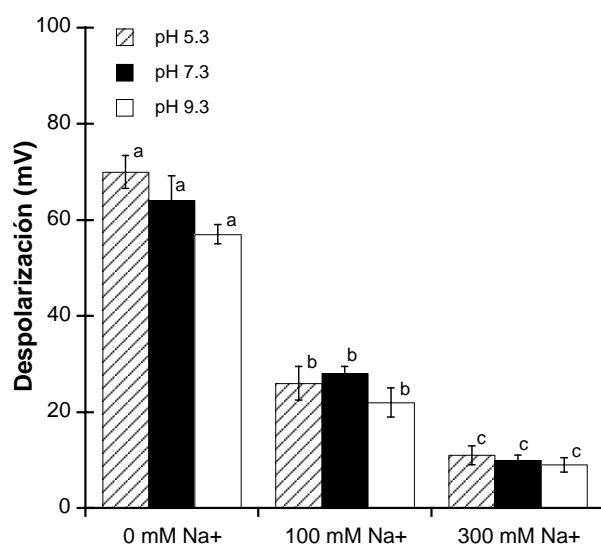


Figura 23. Efecto del pH sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por 1 mM K^+ en plantas cultivadas en distintas concentraciones de Na^+ . Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y en presencia de 0, 100 mM Na^+ ó 300 mM Na^+ en un medio que contenía 2 mM $CaCl_2$, 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3 más la concentración de Na^+ usada en el crecimiento. Una vez estabilizado el potencial de membrana, se añadió 1 mM de K^+ al medio de ensayo y se registraron las despolarizaciones (barras negras). El mismo experimento se realizó en el mismo medio pero tamponado a pH 5,3 (barras rayadas) o 9,3 (barras blancas). Los datos se representan como la media \pm SE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey, $P < 0,05$).

Además, no se observó un efecto significativo del pH del medio sobre el potencial de membrana en cada tratamiento de NaCl; sin embargo, como se ha descrito anteriormente, los valores del potencial de membrana fueron más positivos en los tratamientos con 100 ó 300 mM NaCl, respecto a los registrados en condiciones sin Na⁺ (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto del pH sobre el potencial de membrana en plantas cultivadas en distintas concentraciones de Na⁺. Valores estables de E_m previos a la adición de 1 mM KCl en células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K⁺ y en presencia de diferentes concentraciones de Na⁺. Las medidas se realizaron en un medio que contenía 2 mM CaCl₂ y la misma concentración de Na⁺ que el medio de cultivo (0, 100 mM o 300 mM NaCl) variando la proporción de MES-Bis tris propano (10 mM) para tamponar a diferentes pH: 7,3; 5,3 y 9,3. Los valores corresponden a la media \pm SD del número de réplicas indicado (n). Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey; $P < 0,05$).

Na ⁺ (mM)	E_m (mV) pH 5,3	E_m (mV) pH 7,3	E_m (mV) pH 9,3
0 mM Na ⁺	-202 \pm 16 (n=3) ^a	-203 \pm 18 (n=3) ^a	-189 \pm 13 (n=3) ^a
100 mM Na ⁺	-183 \pm 18 (n=4) ^b	-181 \pm 8 (n=7) ^b	-178 \pm 9 (n=4) ^b
300 mM Na	-171 \pm 8 (n=4) ^b	-176 \pm 15 (n=4) ^b	-172 \pm 11 (n=4) ^b

III.1.4.6. Efecto del NH₄⁺

Se sabe que el amonio es un inhibidor de los transportadores de alta afinidad para K⁺ de tipo HAK (Santa María *et al.*, 1997; Su *et al.*, 2007), de modo que se analizó el efecto sobre el transporte del mismo, añadiéndolo a una concentración de 1 mM tanto en el medio de cultivo como en el medio de ensayo. Como se indicó en el apartado Material y Métodos, la presencia de amonio en el medio de cultivo inducía la despolarización de la membrana (datos no mostrados). Para tratar de evitar este problema, se añadió al medio de cultivo una fuente de N adicional, nitrato. Así, se cultivaron plántulas de *H. portulacoides* en un medio que contenía de 2 mM Ca(NO₃)₂ (en vez de 2 mM CaCl₂, condiciones control) y se analizó si la presencia de 2 mM Ca(NO₃)₂ afectaba a las despolarizaciones inducidas por K⁺. Como se puede observar (Fig. 24), concentraciones crecientes de K⁺ dieron lugar a despolarizaciones similares a las producidas en presencia de 2 mM CaCl₂ (apartado III.1.2.1).

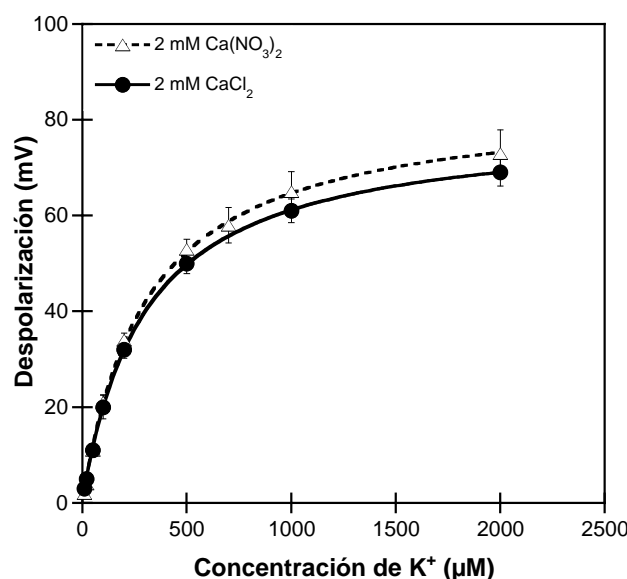


Figura 24. Despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ en plantas preincubadas en 2 mM $CaCl_2$ ó 2mM $Ca(NO_3)_2$. El potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas crecidas en 2 mM $CaCl_2$ (círculos) ó 2 mM $Ca(NO_3)_2$ (triángulos) se midió en el mismo medio de crecimiento tamponado con 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3. Los valores de las despolarizaciones inducidas por la adición de concentraciones crecientes de K^+ al medio de ensayo, se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 9. Los datos se representan como la media \pm SE de 4 a 8 réplicas.

Además, se pudo concluir que la presencia de nitrato en el medio de crecimiento no afectaba ni a la despolarización máxima ni al valor de K_m , ni tampoco significativamente al potencial de membrana (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de la presencia de nitrato en el medio de crecimiento sobre la cinética de transporte de K^+ . La despolarización máxima (D_{max}) y la constante de semisaturación (K_m) fueron obtenidas ajustando los datos de la Fig. 24 al modelo de Michaelis-Menten. También se incluyen los datos de potencial de membrana de cada tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre los valores del potencial de membrana medidos en las células cultivadas en ausencia o en presencia de NO_3^- (t de Student, $P > 0,05$).

Medio de crecimiento	D_{max} (mV)	K_m (μM)	E_m (mV)
2 mM $CaCl_2$	79 ± 1	296 ± 4	-204 ± 9 (n=8)
2mM $Ca(NO_3)_2$	84 ± 1	305 ± 11	-190 ± 7 (n=4)

Una vez comprobado que la presencia de nitrato en el medio de cultivo y ensayo no afectaba al transporte de K^+ , se procedió a cultivar las plántulas en presencia de 1 mM NH_4^+ , obteniéndose en este caso valores de potenciales de membrana similares al control en ausencia de NH_4^+ (Tabla 10). En estas condiciones, se analizaron las

despolarizaciones inducidas por K^+ , observándose una ligera inhibición del transporte del mismo (Fig. 25).

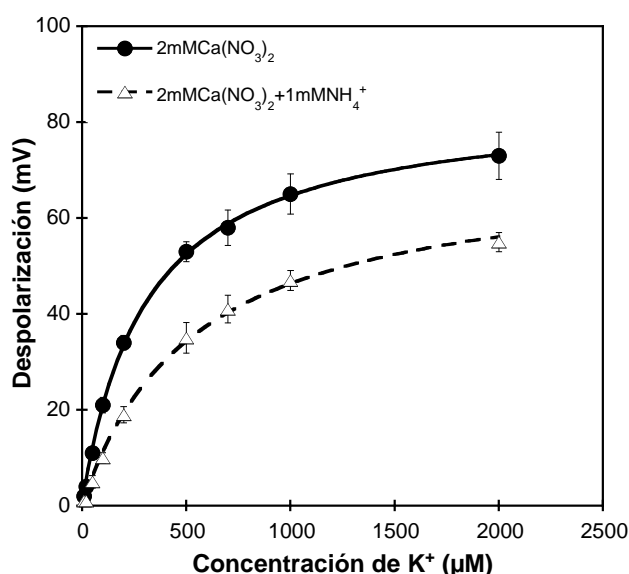


Figura 25. Despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ en plantas cultivadas en 2 mM $Ca(NO_3)_2$ ó 2mM $Ca(NO_3)_2$ + 1 mM NH_4^+ . Los potenciales de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas crecidas en 2mM $Ca(NO_3)_2$ (círculos) o 2mM $Ca(NO_3)_2$ + 1mM NH_4Cl (triángulos) se midieron en el mismo medio de crecimiento tamponado con 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3. Los valores de las despolarizaciones inducidas por la adición de concentraciones crecientes de K^+ al medio de ensayo, se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 10. Los datos representan la media \pm SE (n = 4).

En concreto, en presencia de NH_4^+ se produjo un aumento de la K_m que, aproximadamente se duplicó, y un ligero descenso de la D_{max} del 16 % (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de la presencia de amonio sobre la cinética de transporte de K^+ en ausencia de Na^+ . La despolarización máxima (D_{max}) y la constante de semisaturación (K_m) fueron obtenidas ajustando los datos de la Figura 25 al modelo de Michaelis-Menten. Se indican los valores del potencial de membrana, en los que no se observaron diferencias significativas por la ausencia o presencia de NH_4^+ (t de Student, $P > 0.05$).

Medio de crecimiento	D_{max} (mV)	K_m (μM)	E_m (mV)
2mM $Ca(NO_3)_2$	84 ± 1	305 ± 11	-190 ± 7 (n=4)
2mM $Ca(NO_3)_2$ +1mM NH_4^+	71 ± 2	537 ± 40	-192 ± 19 (n=4)

El efecto del amonio también se analizó en plantas cultivadas en 300 mM Na^+ . En este caso tampoco se observó un efecto significativo de la presencia de nitrato en el medio de cultivo sobre las despolarizaciones inducidas por K^+ ni sobre el potencial de

membrana (datos no mostrados). Por tanto, se analizaron las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de potasio en plantas preincubadas en presencia de 2mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 300 mM NaCl, 1 mM NH_4Cl como en el control sin amonio (Fig. 26).

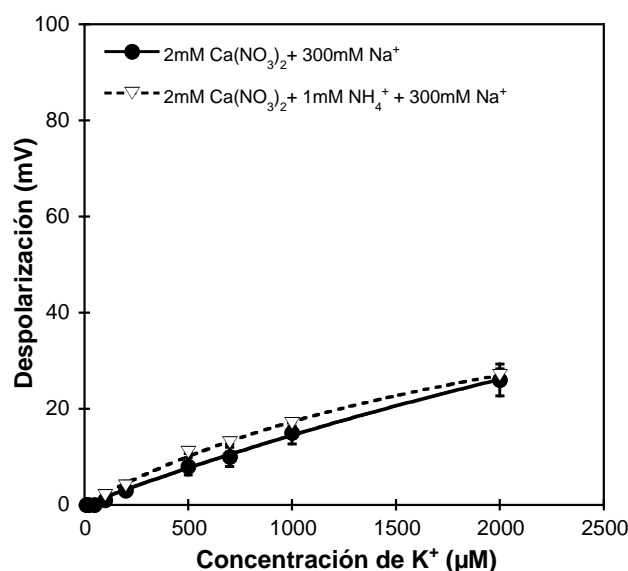


Figura 26. Efecto del amonio en plantas cultivadas en 300 mM NaCl. El potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas crecidas en 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ + 300 mM NaCl (círculos) o 2mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ + 300 mM NaCl + 1 mM NH_4^+ (triángulos) se midieron en el mismo medio de crecimiento tamponado con 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3. Los valores de las despolarizaciones inducidas por la adición de concentraciones crecientes de K^+ al medio de ensayo, se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 11. Los datos se representan como la media \pm SE de al menos 3 repeticiones.

En este caso, el ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten del control, dio lugar a valores de K_m muy por encima del rango de concentraciones de K^+ analizadas (Tabla 11), indicando que para estas concentraciones no se había alcanzado la saturación. No obstante, los valores de K_m , y D_{max} obtenidos en presencia de NH_4^+ (Tabla 11) fueron más parecidos a los observados en presencia de 2 mM CaCl_2 , 300 mM NaCl (Tabla 4). Se procedió entonces a comparar los valores de despolarización para cada concentración, resultando que no había diferencias significativas entre ambos tratamientos (t de Student, $P > 0.05$).

Tabla 11. Efecto de la presencia de NH_4^+ en el medio de crecimiento sobre la cinética de transporte de K^+ en presencia de 300 mM NaCl. La despolarización máxima (D_{\max}) y la constante de semisaturación (K_m) fueron obtenidas ajustando los datos de la Figura 26 al modelo de Michaelis-Menten. Se incluyen también los valores del potencial de membrana, en los que no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos (t de Student, $P > 0,05$).

Medio de crecimiento	D_{\max} (mV)	K_m (μM)	E_m (mV)
2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ + 300mM NaCl	132 ± 32	8135 ± 2362	-173 ± 12 (n=4)
2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ + 300mM NaCl + 1mM NH_4^+	61 ± 6	2522 ± 362	-180 ± 18 (n=3)

III.1.5. Actividad citoplasmática de K^+ en las células radiculares. Cálculo del $\Delta\mu\text{K}^+/\text{F}$

A diferencia del transporte a través de transportadores de K^+ dependientes de protones, el transporte a través de canales se produce a favor de gradiente de potencial electroquímico. Así, se midió la actividad citoplasmática de K^+ en las células radiculares para calcular el gradiente de potencial electroquímico para el K^+ y poder discriminar entre transporte activo o pasivo. El potencial de membrana y la actividad citoplasmática de K^+ de células epidérmicas de la raíz de plántulas crecidas en el medio control (2 mM CaCl_2) o en el mismo medio más 300 mM Na^+ se midieron con microelectrodos dobles selectivos para K^+ . Los potenciales de membrana fueron similares a los obtenidos con microelectrodos simples, siendo ligeramente positivos cuando las plantas se cultivaron a salinidad alta (Tabla 12), como se ha había observado previamente.

Tabla 12. Actividad citoplasmática de K^+ en células radiculares de plantas sometidas a deficiencia de K^+ y cultivadas sin o con Na^+ . Células epidérmicas de la raíz de plantas cultivadas en ausencia o presencia de 300 mM NaCl fueron pinchadas con microelectrodos dobles selectivos para K^+ que miden tanto el potencial de membrana (E_m) como la actividad citoplasmática de K^+ (K^+_c). Los medios de ensayo utilizados fueron los mismos medios utilizados para el crecimiento, pero tamponados con 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3. Los asteriscos indican diferencias significativas (t de Student, $P < 0,05$).

$[\text{Na}^+]$ crecimiento mM	E_m (mV)	K^+_c (mM)
0	-206 ± 10 (n=5)	76 ± 4 (n=5)
300	-160 ± 18 (n=3)*	55 ± 6 (n=3)*

La actividad citoplasmática de K^+ fue mucho mayor (alrededor de 76 mM K^+) en las plantas cultivadas en ausencia de Na^+ que en las plantas cultivadas en 300 mM Na^+ (en torno a 55 mM K^+). Esto es, la presencia de una alta concentración externa de Na^+ indujo una disminución en la actividad citoplasmática de K^+ que, a su vez, podría afectar el gradiente del potencial electroquímico para K^+ . Así, se calculó el valor de este gradiente para diferentes concentraciones externas de K^+ (Fig. 27). La transición de valores positivos a valores negativos de esta variable, que supone la posibilidad de un transporte a favor de gradiente, se encontró a diferentes concentraciones externas dependiendo del tratamiento. Es decir, que el transporte podría ser considerado pasivo a concentraciones alrededor o superiores a 22 μM K^+ para plantas cultivadas en ausencia de Na^+ , pero a concentraciones por encima de 120 μM K^+ , para plantas cultivadas en presencia de 300 mM Na^+ .

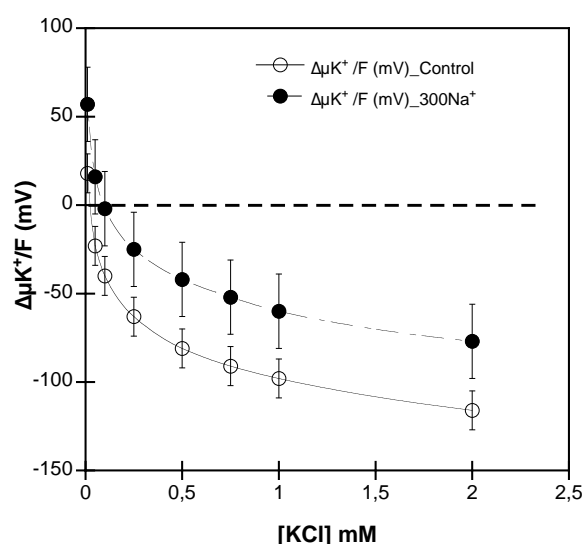


Figura 27. Gradiente de potencial electroquímico para K^+ ($\Delta\mu K^+/F$, en mV) a concentraciones crecientes del mismo en plántulas cultivadas en ausencia o presencia de 300 mM NaCl. El cálculo de dicha variable se realizó considerando los valores de potencial de membrana y de actividad citoplasmática de K^+ que aparecen en la Tabla 12. Los datos representan la media \pm SE de al menos 3 repeticiones.

III.2. Caracterización del transporte de Na^+ en *H. portulacoides*

III.2.1. Incorporación de Na^+ en raíces

Las raíces de plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ y K^+ son capaces de incorporar Na^+ a concentraciones externas en el rango micromolar (Fig. 28). Ello se observó en experimentos de depleción en los que la concentración inicial fue de $500 \mu\text{M}$ Na^+ . En dichos experimentos, se observó una disminución progresiva de la concentración externa de Na^+ (Fig. 28), alcanzándose un valor de alrededor de $280 \mu\text{M}$ Na^+ después de 15 horas de incubación. La tasa inicial de incorporación de Na^+ se calculó en la fase lineal y se obtuvo un valor de $9,6 \pm 1,9 \mu\text{mol Na}^+ \text{ g}_{\text{Raiz}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Esta cifra dobla el valor medido para la incorporación de K^+ en la misma especie ($4,27 \pm 1,7 \mu\text{mol K}^+ \text{ g}_{\text{Raiz}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, Ait Hammou *et al.*, 2014); sin embargo, en este caso la concentración inicial de K^+ en el experimento de depleción fue $250 \mu\text{M}$.

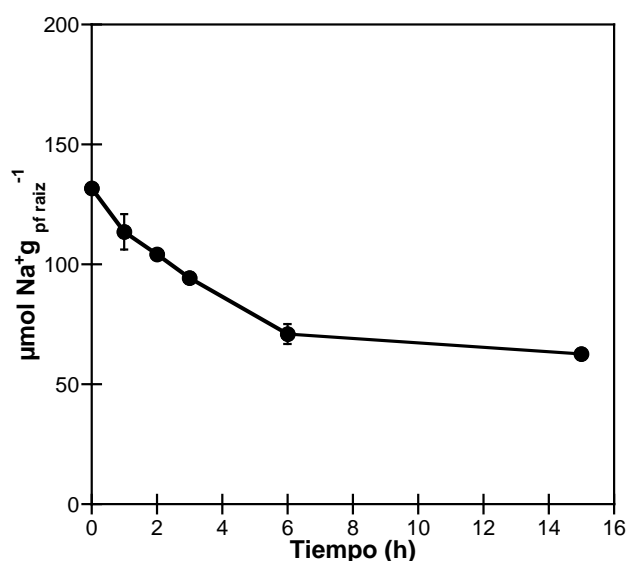


Figura 28. Incorporación de Na^+ en raíces de *H. portulacoides*. Raíces de plántulas crecidas en ausencia de Na^+ y K^+ se sumergieron en una solución que contenía 2 mM CaCl_2 , $1 \text{ mM MES-Bis Tris propano pH } 6$. A tiempo 0, se añadió Na^+ a una concentración de $500 \mu\text{M NaCl}$. Las plántulas se incubaron a diferentes tiempos y la concentración de Na^+ en el medio se analizó mediante espectrometría de absorción atómica. Los datos corresponden a la media \pm SE ($n = 3$).

III.2.2. Transporte de Na^+ en células radiculares

Para caracterizar la incorporación de Na^+ en estas plantas, se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plantas cultivadas en ausencia de Na^+ y K^+ , y se registró el efecto de la adición de Na^+ al medio de ensayo. Estas células mostraron un potencial de membrana medio de -185 ± 24 mV ($n = 12$) y la adición de concentraciones micromolares de Na^+ provocó despolarizaciones rápidas, que fueron mayores al aumentar las concentraciones de Na^+ (Fig. 29).

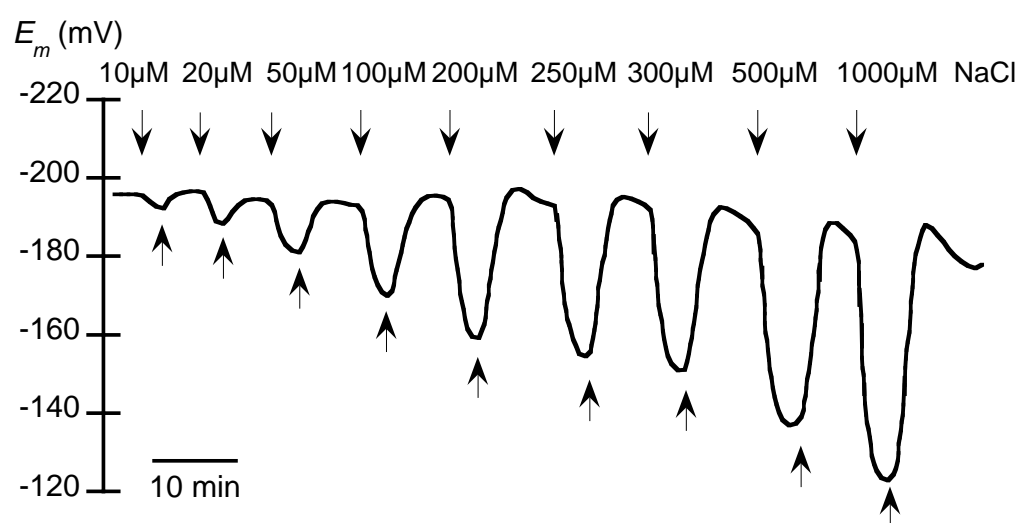


Figura 29. Despolarizaciones de la membrana inducidas por concentraciones crecientes de Na^+ . Las medidas de E_m se realizaron en raíces de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ . El medio de ensayo contenía 2mM CaCl_2 , pH 6 (10 mM MES-Bis Tris propano). Las flechas superiores muestran el momento en el que se añadía NaCl al medio y las flechas inferiores muestran el momento en el que se retiraba del mismo.

Las despolarizaciones de membrana, que son una estimación de la actividad del transporte, mostraron una cinética de saturación y se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten (Fig. 30), obteniéndose una despolarización máxima (D_{max}) de alrededor de 70 mV (67 ± 2 mV) y una constante de semisaturación, K_m , de alrededor de 600 μM Na^+ (597 ± 47 μM Na^+).

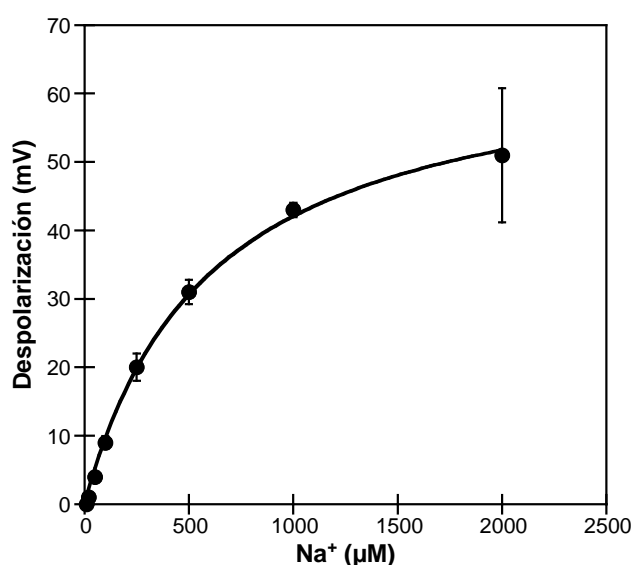


Figura 30. Despolarizaciones de membrana inducidas por Na⁺ en células radiculares de *H. portulacoides*. Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K⁺ y Na⁺ en un medio que contenía 2 mM CaCl₂, 10 mM MES-Bis Tris Propano, pH 6 y se añadieron concentraciones crecientes de Na⁺ como NaCl. Los valores de las despolarizaciones se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten y los parámetros cinéticos se indican en el texto. Los datos representan la media \pm SE de al menos 3 réplicas.

III.2.3. Efecto del Rb⁺, Cs⁺ y Ba²⁺ sobre el transporte de Na⁺

Como se había observado previamente que los iones Rb⁺, Cs⁺ y Ba²⁺ inhibían el transporte de K⁺ en *H. portulacoides*, se analizó y comparó el efecto de estos iones sobre las despolarizaciones inducidas por Na⁺ y por K⁺ a pH 6 (Fig. 31). Como se observó en experimentos realizados a pH 7,3, la adición de estos inhibidores no afectó al valor del potencial de membrana.

Ni el Rb⁺ ni el Cs⁺, a una concentración de 500 μM, tuvieron un efecto significativo sobre el transporte de Na⁺ (Figs. 31 A y 31 B), mientras que sí se detectó una inhibición del transporte de K⁺, como se había observado previamente en experimentos realizados con K⁺ a pH 7,3 (Fig. 13 y Fig. 19). La adición de 5 mM Ba²⁺ tuvo un efecto significativo sobre el transporte de Na⁺ (Fig. 31C), produciendo una inhibición de alrededor de 30%. Sin embargo, este efecto inhibitor fue mucho mayor en el transporte de K⁺, que se inhibió casi completamente, como se observó a pH 7,3 (Fig. 21). Estos resultados sugieren que el transporte de Na⁺ no estaría mediado por los mismos sistemas de transporte usados por el K⁺.

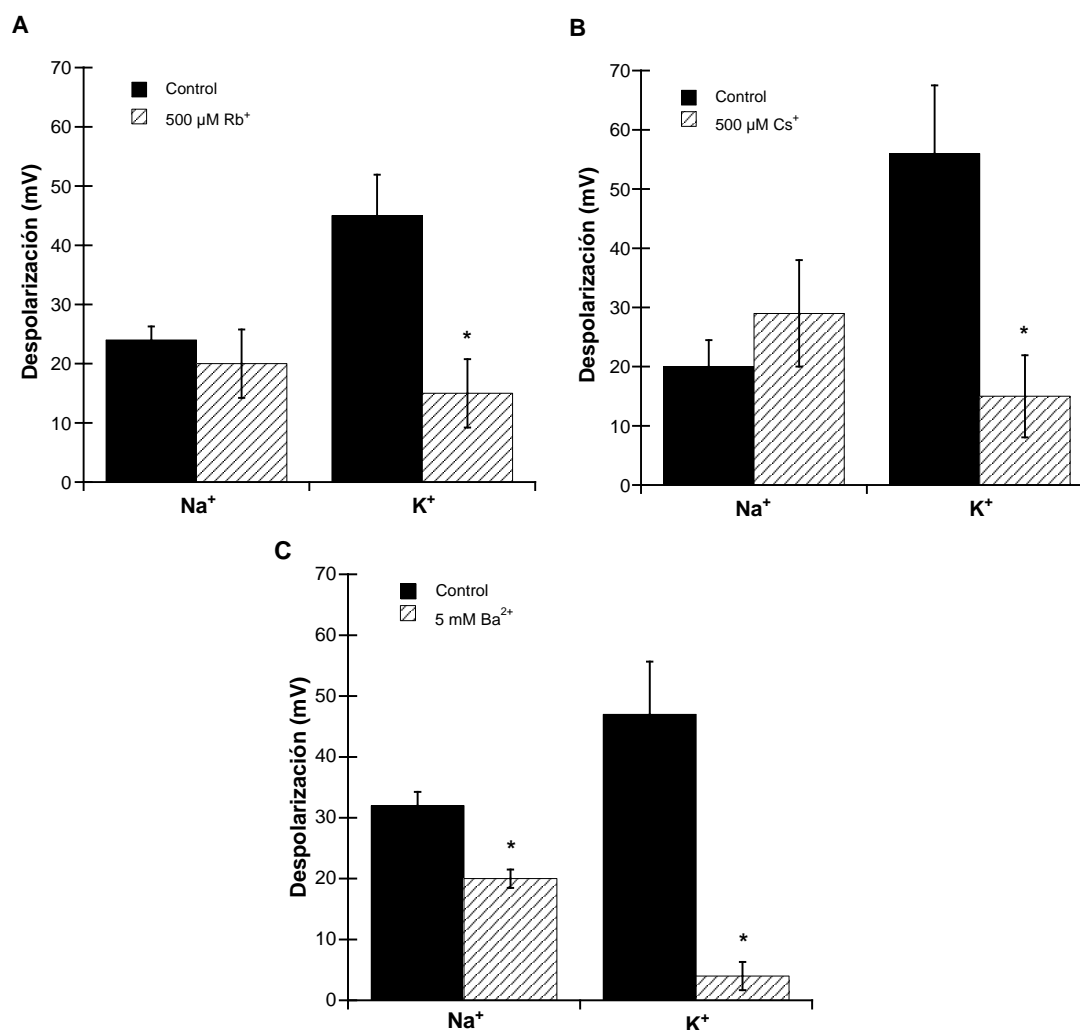


Figura 31. Efecto de Rb^+ (A), Cs^+ (B) y Ba^{2+} (C) sobre las despolarizaciones inducidas por Na^+ y K^+ en células radiculares de *H. portulacoides*. Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ en un medio que contenía 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris Propano, pH 6. Una vez estabilizado el potencial de membrana, se añadía 500 μM NaCl ó 500 KCl en ausencia (barras negras) o en presencia del inhibidor (barras rayadas): 500 μM RbCl (A), 500 μM CsCl (B) or 5 mM BaCl_2 (C). Los datos representan la media \pm SE de al menos cuatro réplicas. Los asteriscos representan medias significativamente distintas con respecto a su control correspondiente (t de Student, $P < 0.05$).

III.2.4. Efecto de la presencia de K^+ y Na^+ en el medio de crecimiento sobre el transporte de Na^+

Dado que el transporte de Na^+ de alta afinidad en plantas mediado por transportadores HKT es inhibido por la presencia tanto de K^+ y Na^+ en el medio de crecimiento (Garcíadeblás *et al.*, 2003, Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006, Horie *et al.*, 2007), se analizó el efecto de la presencia de ambos cationes en el medio de cultivo de *H. portulacoides* sobre el transporte de Na^+ (Fig. 32).

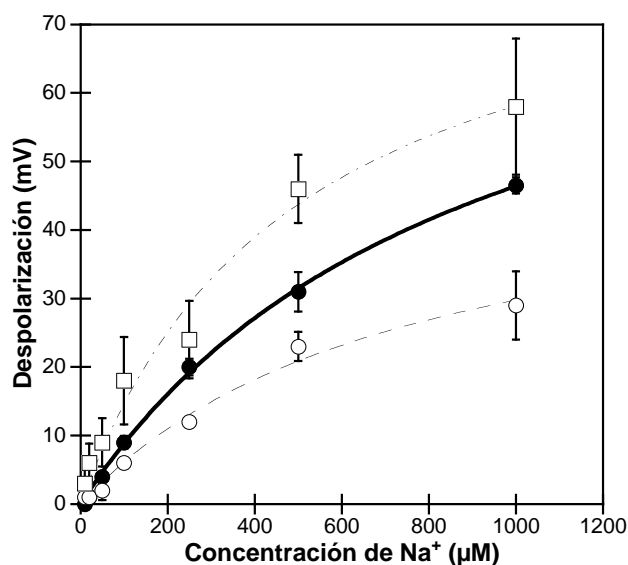


Figura 32. Despolarizaciones de la membrana inducidas por Na⁺ en plantas crecidas en presencia de Na⁺ o K⁺. Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K⁺ y Na⁺ (control, círculos negros), en presencia de 500 µM KCl (círculos blancos) o de 500 µM NaCl (cuadrados blancos) en un medio que contenía 2 mM CaCl₂, 10 mM MES-Bis Tris Propano, pH 6. En todos los casos se registraron las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de Na⁺, añadido al medio de ensayo como NaCl. Los valores de las despolarizaciones se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten y los parámetros cinéticos se indican en el texto. Los datos representan la media ± SE de al menos 3 réplicas.

Así, no se encontró ninguna inhibición del transporte de Na⁺ en plantas cultivadas durante tres días en presencia de 500 µM de Na⁺. De hecho, la despolarización máxima, obtenida tras el ajuste de los datos de despolarización a la ecuación de Michaelis-Menten, fue ligeramente mayor ($D_{max} = 86 \pm 11$ mV), que en plantas control cultivadas en ausencia de Na⁺; sin embargo, la afinidad por Na⁺ aumentó en las plantas cultivadas con Na⁺ ($K_m = 488 \pm 134$ µM Na⁺).

Por el contrario, se observó una ligera inhibición del transporte de Na⁺ en las plantas cultivadas con 500 µM K⁺ en el medio de crecimiento. La despolarización máxima disminuyó a 52 ± 7 mV, así como la afinidad por Na⁺ ($K_m = 738 \pm 182$ µM Na⁺). Sin embargo, en presencia de K⁺ en el medio de crecimiento, el potencial de membrana de las células radicales fue más positivo (-147 ± 6 ; $n = 4$), aproximadamente 40 mV más positivo que en las plantas control cultivadas en ausencia K⁺. Por tanto, la disminución observada en el transporte de Na⁺ podría deberse a un menor valor del gradiente de potencial electroquímico para Na⁺, debido a que el E_m es

más positivo. Este efecto inhibitor también se observó cuando el medio de cultivo no contenía K^+ pero se añadía K^+ al medio de ensayo a una concentración de 200 μM (Fig. 33).

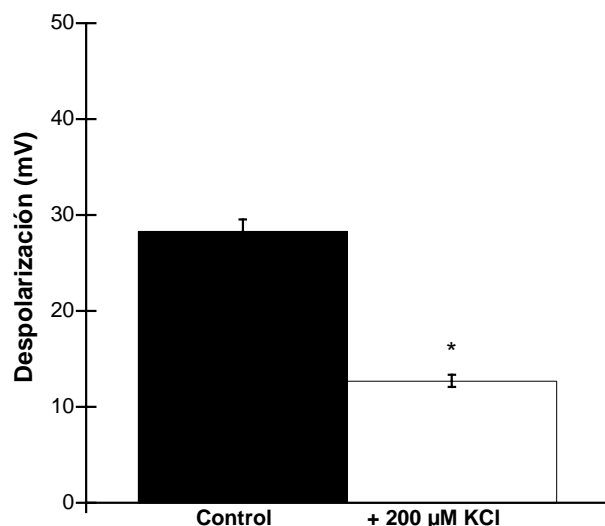


Figura 33. Efecto de la presencia de K^+ sobre las despolarizaciones inducidas por Na^+ . Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ en un medio que contenía 2 mM $CaCl_2$, 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 6. El efecto de la adición de 500 μM NaCl sobre el potencial de membrana se analizó en ausencia (control) o presencia de 200 μM KCl en el medio de ensayo. Los datos representan la media \pm SE de 3 réplicas. El asterisco indica diferencias significativas a $P < 0.05$ (t de Student)

En este caso, el potencial de membrana se incrementó en 30 mV, pasando de una media de -199 ± 22 mV ($n=3$) en ausencia de K^+ a -166 ± 13 mV ($n=3$) en presencia del mismo, observándose una inhibición significativa de casi el 60 % en el transporte de Na^+ (Fig. 33).

III.2.5. Efecto del Li^+ , Ca^{2+} y pH sobre la incorporación de Na^+

Para caracterizar aún más el transporte de Na^+ se comprobó el efecto del Ca^{2+} , un inhibidor el transporte de este ión a través de los canales LCT1 (Amtmann *et al.*, 2001) y algunos canales NSCC (Demidchik y Maathuis, 2007), y del Li^+ , considerado un análogo del Na^+ e inhibidor competitivo del transporte del mismo (Serrano *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). También se analizó el efecto de la concentración de protones, ya que se sabe que afectan a la actividad de algunos NSCC (Demidchik y

Tester, 2002). Como puede observarse en la figura 34, la presencia de 500 mM Li^+ o 10 mM Ca^{2+} no afectó significativamente al transporte de Na^+ .

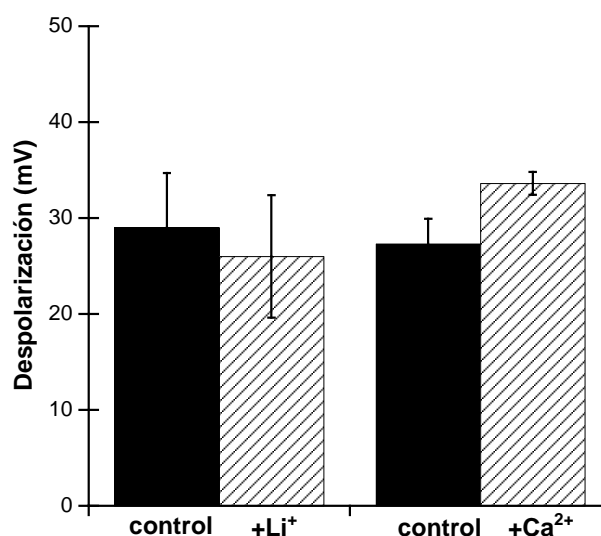


Figura 34. Efecto del Li^+ y del Ca^{2+} sobre las despolarizaciones inducidas por Na^+ . Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ en un medio que contenía 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 6 y se analizó el efecto sobre el potencial de membrana de la adición de 500 μM NaCl . Este mismo experimento se realizó en presencia de 500 μM LiCl en el medio de ensayo o en presencia de 10 mM Ca^{2+} , añadido como CaCl_2 . Los datos representan la media \pm SE ($n=3$). Los valores no presentaron diferencias significativas con respecto a su correspondiente control (t de Student, $P > 0.05$ en cada caso).

Además, no se observaron diferencias significativas entre los valores del E_m obtenidos en presencia o ausencia de Li^+ , ni tampoco en presencia o ausencia de Ca^{2+} (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto del Li^+ y del Ca^{2+} sobre los potenciales de membrana en plantas cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ . Se midieron los E_m antes de la adición de 500 μM LiCl ó 10 mM CaCl_2 en las mismas condiciones y medios de ensayo indicados en la Fig. 34. Los valores corresponden a la media \pm SD de 3 réplicas. No se observaron diferencias significativas entre los valores del potencial de membrana con respecto a su control correspondiente (t de Student, $P > 0,05$ en cada caso).

	E_m (mV)		E_m (mV)
Control	-199 ± 6	Control	-213 ± 7
+ 500 μM LiCl	-206 ± 13	+10 mM CaCl_2	-211 ± 30

Por otro lado, no se encontró ningún efecto significativo sobre las despolarizaciones inducidas por Na^+ cuando el pH del medio de ensayo disminuyó a 5 o se incrementó a 9 (Fig. 35).

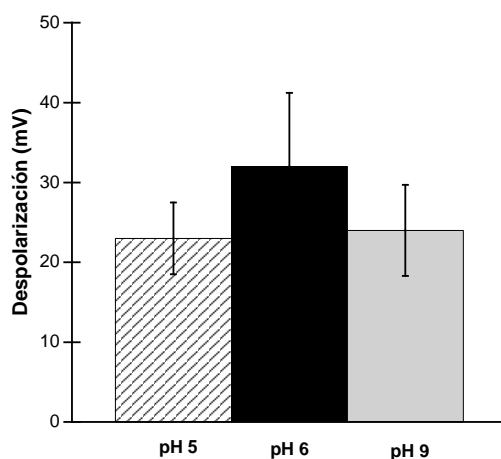


Figura 35. Efecto del pH sobre las despolarizaciones inducidas por Na^+ . Se midió el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ en un medio que contenía 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 6, determinándose el efecto de la adición de 500 μM NaCl . Este mismo experimento se realizó en el mismo medio de ensayo pero tamponado a pH 5 o a pH 9. Los datos representan la media \pm SE de al menos 3 réplicas. Los valores no presentaron diferencias significativas (ANOVA, $P > 0,05$).

III.2.6. Actividad citoplasmática de Na^+ en células radiculares. Cálculo del $\Delta\mu\text{Na}^+/\text{F}$

Se midió la actividad citoplasmática de Na^+ en las células de la raíz con el fin de calcular el gradiente del potencial electroquímico para este ión, y discriminar así entre transporte activo o pasivo. Así, las células epidérmicas de la raíz de plántulas crecidas en ausencia de K^+ y Na^+ se pincharon con microelectrodos dobles selectivos para Na^+ . El potencial de membrana medido con estos microelectrodos fue similar al obtenido con microelectrodos simples (-193 ± 13 mV) y la actividad citoplasmática detectada fue de $25,9 \pm 2,9$ mM ($n = 6$). Con estos valores de potencial de membrana y actividad citoplasmática de Na^+ , se calculó el potencial electroquímico para dicho ión a diferentes concentraciones externas del mismo (Fig. 36).

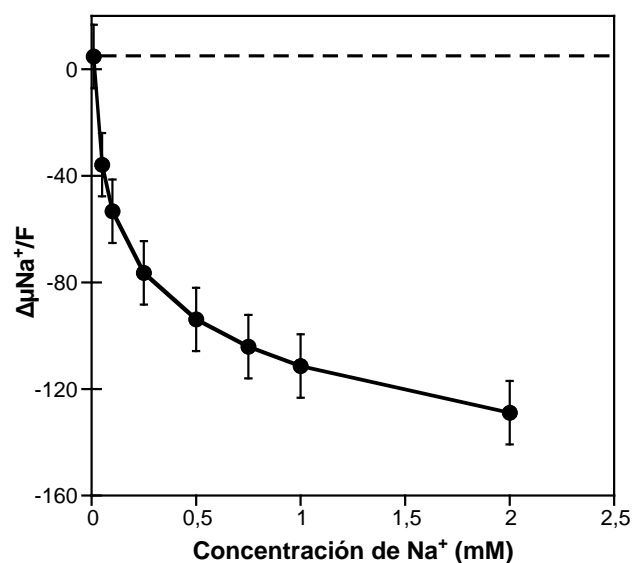


Figura 36. Gradiente de potencial electroquímico para Na⁺ ($\Delta\mu_{Na^+}/F$) a distintas concentraciones externas de dicho ión. Tomando los valores de potencial de membrana y de actividad citoplasmática de Na⁺ se procedió a calcular el gradiente para el Na⁺ a diferentes concentraciones de Na⁺ para las distintas replicas. Los datos corresponden a la media \pm SD (n=6)

La transición de valores positivos a negativos de este gradiente, se situó entre 10 y 20 μM Na⁺ ($13 \pm 5 \mu\text{M}$), justo las concentraciones externas de Na⁺ a las que se observaron despolarizaciones de membrana, pequeñas pero detectables. Este resultado indica que el transporte de Na⁺ sería pasivo a concentraciones superiores a 10 μM para las plantas cultivadas en ausencia de Na⁺.

III.3. Homeostasis citoplasmática de Na^+ en *H. portulacoides*

III.3.1. Efecto del Na^+ sobre el crecimiento de plántulas y sobre los contenidos totales de Na^+ y K^+

Al objeto de comprobar el efecto de la presencia de diferentes concentraciones de Na^+ sobre el crecimiento de plántulas de *H. portulacoides* se analizó el incremento de longitud relativo de la raíz y del hipocótilo de plántulas procedentes de la germinación de semillas en agua destilada y transferidas a medio Hoagland $\frac{1}{4}$ suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (0, 75, 150 y 300 mM). Tras 7 días de cultivo en medio líquido, se observó un mayor crecimiento en las plántulas cultivadas en el medio suplementado con 150 y 300 mM NaCl (Fig. 37) con respecto al control en ausencia de Na^+ . El efecto de dichas concentraciones de NaCl resultó significativo tanto en el crecimiento relativo de la raíz como en el del hipocótilo a 300 mM NaCl, pero sólo en el caso de la raíz a 150 mM NaCl (Fig. 37).

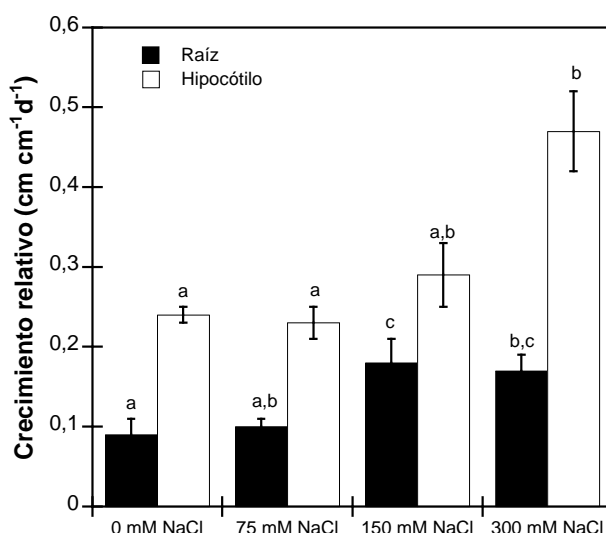


Figura 37. Efecto de la presencia de Na^+ sobre el crecimiento relativo de plántulas de *H. portulacoides*. Tras dos días de germinación en agua destilada las semillas se transferían a medio Hoagland $\frac{1}{4}$ suplementado con las diferentes concentraciones de NaCl indicadas. El crecimiento se cuantificó por separado en raíz (columnas negras) y en hipocótilo (columnas blancas) como el incremento de longitud relativo tras 7 días de cultivo. Los datos corresponden con la media \pm SE de los datos de 3 a 6 plántulas. En cada caso diferentes letras indican diferencias significativas (test de Tukey, $P < 0,05$).

Por otra parte, también se analizaron los contenidos totales de Na^+ y K^+ en la raíz y en los cotiledones de estas mismas plántulas, cultivadas en ausencia o en presencia de 300 mM NaCl. Los resultados obtenidos mostraron un mayor contenido de K^+ respecto a Na^+ , tanto en la raíz como en los cotiledones, en el caso de las plántulas

cultivadas en ausencia de Na^+ , mientras que en el caso de las plántulas cultivadas en presencia de 300 mM Na^+ se observó la reducción casi a la mitad del contenido total de K^+ y un aumento del contenido de Na^+ , resultando un incremento de 14 y casi 70 veces de la relación Na^+/K^+ en las raíces y los cotiledones, respectivamente, de plántulas cultivadas en presencia de 300 mM Na^+ respecto a las cultivadas en ausencia de tratamiento salino (Tabla 14).

Tabla 14. Contenido total de Na^+ y K^+ en raíces y cotiledones de plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia o en presencia de 300 mM NaCl. Las medidas se realizaron por espectrometría de absorción atómica utilizando muestras desecadas de raíces y cotiledones procedentes de plántulas cultivadas durante 7 días en medio Hoagland $\frac{1}{4}$ en ausencia o en presencia de 300 mM NaCl. Los valores, expresados como % de Peso Seco corresponden a la media \pm SD (n=3). El índice Na^+/K^+ se calculó como la ratio entre los contenidos totales medios referidos al peso atómico de cada catión.

	Raíz			Cotiledón		
	Na^+ (%)	K^+ (%)	Na^+/K^+	Na^+ (%)	K^+ (%)	Na^+/K^+
0 mM NaCl	$0,68 \pm 0,02$	$4,55 \pm 0,08$	0,3	$0,22 \pm 0,01$	$1,85 \pm 0,02$	0,2
300 mM NaCl	$5,71 \pm 0,06$	$2,32 \pm 0,05$	4,2	$6,89 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,05$	13,5

Estos resultados indican que tras la germinación en agua destilada las plántulas de *H. portulacoides* crecen más si el medio contiene concentraciones de NaCl superiores a 150 mM. Asimismo, el incremento del índice Na^+/K^+ tanto en las raíces como en los cotiledones de plántulas cultivadas en condiciones de alto Na^+ sugiere que esta planta presentaría una elevada permeabilidad a este ión.

III.3.2. Efecto del Na^+ sobre la permeabilidad relativa Na^+/K^+ en células epidérmicas de la raíz

La permeabilidad relativa de la membrana a un ión puede estimarse mediante la medida de la variación del potencial de difusión en respuesta a diferentes concentraciones de dicho ión a partir de la ecuación de Goldman (ecuación 5), asumiendo que la actividad citoplasmática de dicho ión no varía en respuesta a la variación de su concentración externa cuando el potencial de membrana alcanza el valor del potencial de difusión (Maathuis y Prins, 1990; Fernández *et al.*, 1999). En el caso de las células epidérmicas de la raíz de *H. portulacoides* la estimación de la permeabilidad relativa Na^+/K^+ se realizó en plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ (2 mM CaCl_2 ; 1 mM KCl; 0.7 % fitoagar) y en plántulas cultivadas en presencia de 300 mM Na^+ (2 mM CaCl_2 ; 1 mM KCl; 300 mM NaCl, 0.7 % fitoagar).

En las plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ el valor medio del potencial de difusión obtenido tras la adición de 0,1 mM KCN-SHAM (inhibidores de la respiración) al medio de ensayo (2 mM CaCl_2 ; 1 mM NaCl ; 1 mM KCl ; 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3) resultó -84 ± 8 mV ($n=8$). El incremento secuencial de la concentración externa de Na^+ desde 1 hasta 50 mM NaCl provocó el aumento del potencial de difusión mostrando una relación lineal respecto al logaritmo de la concentración externa de dicho ión (Fig. 38 A). Del mismo modo, el incremento de la concentración externa de K^+ (5, 10, 25 y 50 mM KCl) provocó el aumento del potencial de difusión, cuyos valores también mostraron una relación lineal respecto al logaritmo de la concentración externa de K^+ (Fig. 38 A).

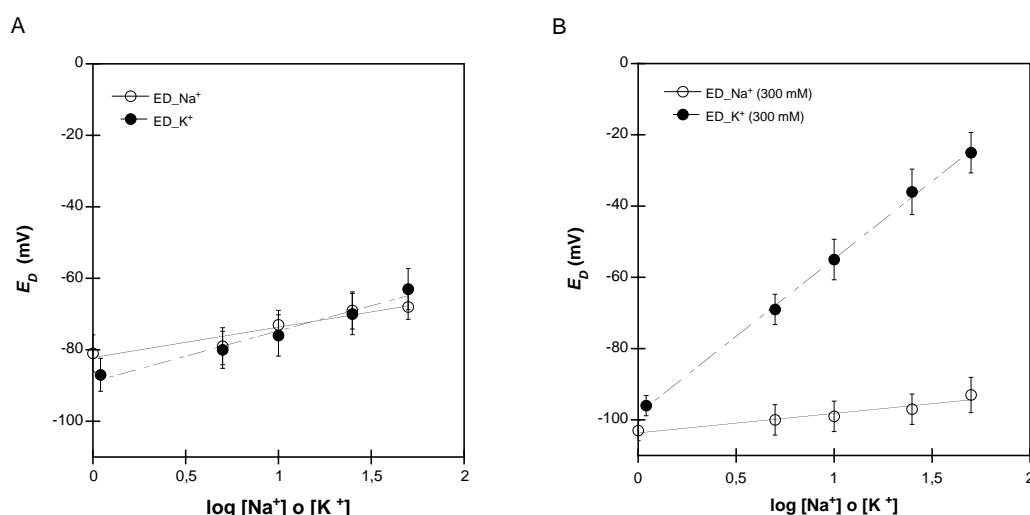


Figura 38. Variación del potencial de difusión en función de la concentración externa de Na^+ o K^+ . Las medidas se realizaron en células epidérmicas de la raíz de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia de Na^+ (A) o en presencia de 300 mM NaCl (B). En ambos casos tras la adición de 0,1 mM KCN-SHAM al medio de ensayo (2 mM CaCl_2 , 1 mM KCl , 1 mM NaCl , 10 mM MES-Bis Tris propano, pH: 7,3) se incrementaba la concentración externa de Na^+ (1, 5, 10, 25 y 50 mM NaCl) o de K^+ (5, 10, 25 y 50 mM KCl). Los valores, correspondientes a la media \pm SE ($n=5$) del valor del potencial de difusión estable para cada concentración externa de K^+ (círculos negros) o de Na^+ (círculos blancos), se ajustaron a un modelo lineal respecto al logaritmo de la concentración externa de cada catión.

La pendiente obtenida para cada una de las rectas, que estima la permeabilidad de la membrana a cada ión, resultó significativamente distinta, siendo el doble del valor obtenido para el caso de K^+ que para Na^+ (Tabla 15). El valor de la permeabilidad relativa de la membrana a Na^+ respecto a K^+ ($P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+}$) en células epidérmicas de la raíz de plántulas crecidas en ausencia de Na^+ resultó próxima a 0,5 (Tabla 15).

En el caso de las plántulas crecidas en presencia de 300 mM NaCl, el valor medio del potencial de difusión tras la adición de 0,1 mM KCN-SHAM al medio de ensayo (2 mM CaCl₂; 1 mM KCl; 10 mM MES-Bis Tris propano) fue más negativo (-99 ± 5 mV; n=6) que en el caso de las plántulas crecidas en ausencia de Na⁺. El incremento secuencial de la concentración externa de Na⁺ (1, 5, 10, 25 y 50 mM NaCl) provocó el incremento del E_D , ajustándose los valores a un modelo lineal respecto al logaritmo de la concentración externa de Na⁺ (Fig. 38 B). La pendiente obtenida, estimador de la permeabilidad a Na⁺, fue similar al valor obtenido en el caso de las plántulas cultivadas en ausencia de Na⁺ (Tabla 15).

Por otra parte, el incremento secuencial de la concentración externa de K⁺, en el mismo rango que el usado para el caso de Na⁺ (5, 10, 25 y 50 mM KCl) provocó un incremento mucho mayor del E_D respecto al observado con el ión Na⁺ (Fig. 38 B). Dicho incremento del E_D en respuesta al aumento de la concentración externa de K⁺ en plántulas cultivadas en presencia de 300 mM NaCl también fue mayor que el observado, tanto con Na⁺ como con K⁺, en las plántulas cultivadas en ausencia de Na⁺. Del mismo modo que se ha descrito para el resto de tratamientos, los valores del potencial de difusión se ajustaron a un modelo lineal respecto al logaritmo de la concentración externa de K⁺, siendo en este caso la pendiente de la recta mucho mayor que las obtenidas para Na⁺ o para K⁺ en el caso de las plántulas cultivadas en ausencia de tratamiento salino (Tabla 15). En estas condiciones, se estimó un valor de permeabilidad relativa próximo a 0,1 (Tabla 15).

Tabla 15. Permeabilidad relativa de la membrana a Na⁺ y K⁺ de células epidérmicas de la raíz de plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia o en presencia de 300 mM NaCl. La permeabilidad de la membrana a K⁺ (P_{K^+} , mV) y a Na⁺ (P_{Na^+} , mV) es la pendiente del ajuste a un modelo lineal de la variación del potencial de difusión respecto a la concentración externa de cada ión mostrados en la Figura 38. Se muestran los valores medios (\pm SD), para cada ión; diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Tukey; $P < 0,05$). En cada condición de cultivo, la permeabilidad relativa a Na⁺ respecto a K⁺ (P_{Na^+}/P_{K^+}) resulta de la relación entre ambas pendientes; el asterisco indica diferencias significativas respecto al tratamiento control (t de Student, $P < 0,05$).

	P_{K^+} (mV)	P_{Na^+} (mV)	P_{Na^+}/P_{K^+}
0 mM NaCl	15 ± 4^a	7 ± 4^b	$0,52 \pm 0,23$ (n=5)
300 mM NaCl	44 ± 4^c	5 ± 2^b	$0,12 \pm 0,03^*$ (n=3)

Estos resultados sugieren que la presencia de elevadas concentraciones de Na^+ en el medio de crecimiento da lugar a la disminución, en torno al 76 %, de la permeabilidad relativa Na^+/K^+ , favoreciendo la entrada pasiva de K^+ respecto a la de Na^+ .

III.3.3. Efecto de la concentración externa de Na^+ sobre la actividad citoplasmática de Na^+ en plántulas crecidas en ausencia del mismo

Tal y como se indicó en el apartado II.2.6., las células epidérmicas de la raíz de plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia de Na^+ y K^+ (2 mM CaCl_2 ; 0,7 % fitoagar) mostraron una actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+_c) de 26 ± 3 mM (n=5). El medio de ensayo fue similar al medio de crecimiento, tamponado con 10 mM MES-Bis Tris propano (pH 7,3). Estas medidas se realizaron en continuo con microelectrodos dobles sensibles a Na^+ , de modo que en estos experimentos se pudo analizar también el efecto de la variación de la concentración externa de Na^+ sobre la Na^+_c .

Así, según se muestra en la figura 39, un registro representativo de estos experimentos, la adición de concentraciones crecientes de Na^+ (1; 10 y 60 mM NaCl) al medio de ensayo provocó la despolarización del potencial de membrana y un incremento simultáneo de la actividad citoplasmática de Na^+ . Así, la adición de 1 mM NaCl al medio de ensayo provocó una despolarización de unos 30 mV y un incremento de la actividad citoplasmática de Na^+ desde valores próximos a 21 mM hasta valores en torno a 28 mM Na^+ . Tras el lavado del Na^+ añadido, el potencial de membrana recuperó los valores iniciales, mientras que la concentración de Na^+ sólo se recuperó parcialmente (Fig. 39). En esa misma célula, la adición de 10 mM NaCl provocó una despolarización próxima a los 45 mV del potencial de membrana simultáneamente al incremento de la actividad citoplasmática de Na^+ hasta valores en torno a 39 mM. Tras el lavado de la concentración de Na^+ añadida, el potencial de membrana recuperó los valores iniciales, mientras que los valores de la actividad citoplasmática de Na^+ permanecieron en torno a 28 mM. Finalmente, la adición de 60 mM Na^+ al medio de ensayo provocó una despolarización de unos 60 mV y un incremento de la actividad citoplasmática de Na^+ , que alcanzó valores en torno a 51 mM.

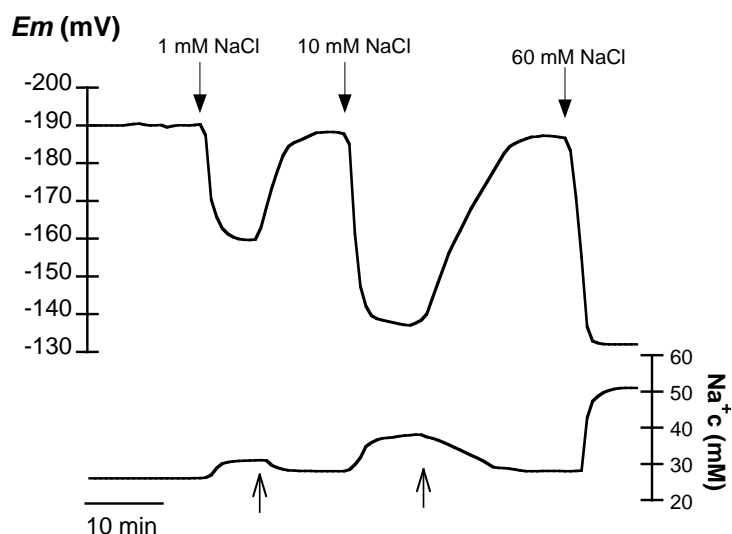


Figura 39. Efecto de la variación de la concentración externa de Na^+ sobre el E_m y la actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+_c) en plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ . Se muestra un registro simultáneo del potencial de membrana (trazo superior) y de la actividad citoplasmática de Na^+ (trazo inferior). Las medidas se realizaron en 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris propano (pH: 7,3). Las flechas superiores indican el momento de la adición al medio de ensayo de concentraciones crecientes de NaCl, las flechas inferiores el momento de su retirada. Se trata de un registro representativo de 3 a 5 experimentos independientes.

Los valores medios del potencial de membrana y de la actividad citoplasmática de Na^+ en función de la concentración externa de este ión, de un mínimo de tres réplicas, se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de potencial de membrana y de actividad citoplasmática de Na^+ en células epidérmicas de la raíz de plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en condiciones control. Las medidas se realizaron en 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris Propano (pH: 7,3) al que se le añadía la concentración de NaCl indicada. Se muestran los valores medios (\pm SD) del potencial de membrana (E_m) y de la actividad citoplasmática de sodio (Na^+_c) estable en cada uno de los tratamientos de Na^+ aplicados. Para cada variable, diferentes letras indican diferencias significativas (Test de Tukey; $P < 0,05$).

	E_m (mV)	Na^+_c (mM)
0 Na^+	-193 ± 12^a	26 ± 3 (n=6) ^a
1 mM Na^+	-159 ± 12^b	31 ± 2 (n=5) ^{a,b}
10 mM Na^+	$-148 \pm 11^{b,c}$	38 ± 2 (n=3) ^b
60 mM Na^+	-130 ± 3^c	51 ± 8 (n=3) ^c

Los resultados obtenidos sugieren que existe una entrada neta de Na^+ al citoplasma en respuesta al incremento, en rango milimolar, de la concentración externa de este ión en el caso de plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ .

III.3.4. Efecto de la concentración externa de Na^+ sobre la actividad citoplasmática de Na^+ en plántulas crecidas en presencia del mismo

La actividad citoplasmática de Na^+ medida en células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en presencia de 300 mM Na^+ (2 mM CaCl_2 , 300 mM NaCl , 0,7 % fitoagar) fue mayor que la observada en el caso de las plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ , descrita en el apartado anterior. El valor medio de la actividad citoplasmática de Na^+ de las plántulas cultivadas en presencia de 300 mM NaCl , medido en un medio similar al medio de crecimiento, tamponado con 10 mM MES-Bis Tris propano (pH 7,3) fue próxima a 70 mM (Tabla 17).

El valor medio del potencial de membrana, medido simultáneamente, se situó en torno a -150 mV, valor similar al descrito para el caso de las medidas con microelectrodos de K^+ en plántulas cultivadas en 300 mM NaCl (Tabla 12) y con microelectrodos simples (Tabla 4).

Tabla 17. Valores de potencial de membrana y de actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+c) en células epidérmicas de la raíz de plántulas de *H. portulacoides* cultivadas presencia de 300 mM NaCl . Las medidas se realizaron en 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris Propano (pH 7,3) en presencia de 300 mM NaCl o 100 mM NaCl y 355 mM sorbitol para mantener la osmolaridad del medio. Se muestran los valores medios (\pm SD) del potencial de membrana (E_m) y de la actividad citoplasmática de sodio (Na^+c) estable en cada uno de los tratamientos de Na^+ aplicados. Para cada variable, el asterisco indica diferencias significativas (t de Student; $P < 0,05$).

	E_m (mV)	Na^+c (mM)
300 mM Na^+	-153 ± 13	72 ± 5 (n=9)
100 mM Na^+	$-182 \pm 2^*$	$55 \pm 8^*$ (n=5)

La disminución de la concentración externa de Na^+ hasta 100 mM NaCl , en presencia de 335 mM sorbitol para mantener constante la osmolaridad del medio (0,567 OSM Kg^{-1}) provocó la hiperpolarización de la membrana, hasta valores próximos a -

180 mV, al mismo tiempo que disminuía la actividad citoplasmática Na^+ , que alcanzó valores en torno a 55 mM (Fig. 40). La restauración de la concentración inicial de Na^+ del medio (300 mM NaCl) provocó la despolarización de la membrana y el incremento de la actividad citoplasmática de Na^+ hasta valores próximos a los iniciales (Fig. 40).

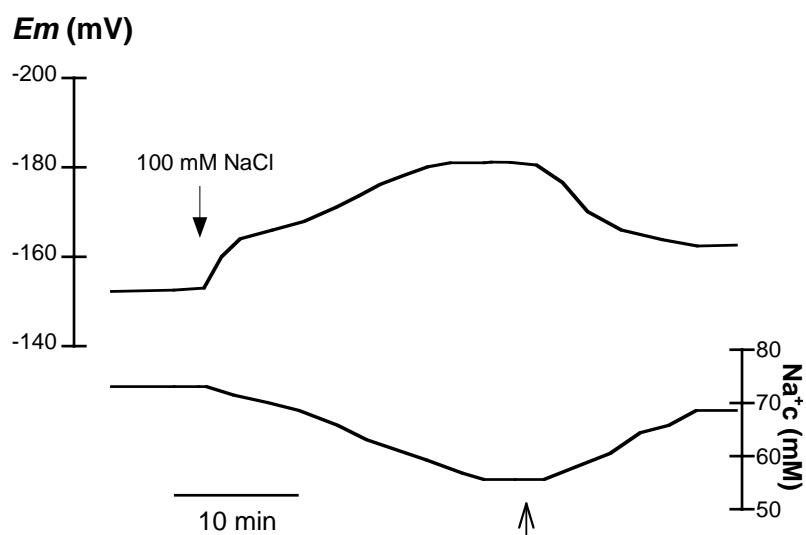


Figura 40. Efecto de la variación de la concentración externa de Na^+ sobre el E_m y la actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+_c) en plántulas cultivadas en presencia de 300 mM Na^+ . Se muestra un registro simultáneo del potencial de membrana (trazo superior) y de la actividad citoplasmática de Na^+ (trazo inferior). Las medidas se realizaron en 2 mM CaCl_2 , 300 mM NaCl, 10 mM MES-Bis Tris propano (pH: 7,3). La flecha superior indica el momento de la disminución de la concentración de Na^+ del medio hasta 100 mM en presencia de 335 mM sorbitol; la flecha inferior indica el momento de la restauración del medio inicial. Se trata de un registro representativo de 5 experimentos independientes.

Estos resultados indican que *H. portulacoides* muestra una mayor actividad citoplasmática de Na^+ cuando crece en medios con una elevada concentración de este ión que en ausencia del mismo; no obstante, la disminución de la actividad citoplasmática de Na^+ , registrada al disminuir la concentración externa de este ión hasta 100 mM, sugiere que existe una salida neta desde el citoplasma de las células epidérmicas de la raíz. Ello indica que la concentración citoplasmática de Na^+ es muy sensible a la concentración externa del mismo, lo que puede estar relacionado con la alta permeabilidad de la membrana a este ión.

III.3.5. Efecto de la adición de inhibidores de la respiración sobre la actividad citoplasmática de Na^+ en plántulas crecidas en ausencia o en presencia de Na^+

Al objeto de determinar la implicación de mecanismos activos de transporte sobre el mantenimiento de la actividad citoplasmática de Na^+ en las células epidérmicas de la raíz de plántulas de *H. portulacoides* se analizó el efecto de la adición de la mezcla de inhibidores de la respiración (0,1 mM NaCN-SHAM) sobre la actividad citoplasmática de Na^+ en plántulas crecidas en ausencia o en presencia de 300 mM Na^+ .

En el caso de las plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ las medidas se realizaron en medios de ensayo que contenían 60 mM Na^+ (2 mM CaCl_2 , 60 mM NaCl, 10 mM MES-Bis Tris propano, pH 7,3). La adición de los inhibidores de la respiración provocó la despolarización de la membrana hasta el valor del potencial de difusión para esa concentración externa de Na^+ , (-72 ± 4 mV; $n=3$), mientras que no tuvo un efecto significativo (t de Student, $P>0,05$) sobre la actividad citoplasmática de Na^+ que pasó de 51 ± 8 mM a 54 ± 7 mM (Fig. 41).

Por otra parte, en el caso de las plántulas cultivadas en presencia de 300 mM Na^+ la adición de los inhibidores de la respiración al medio de ensayo (2 mM CaCl_2 , 300 mM NaCl, 10 mM MES-Bis tris propano, pH 7,3) provocó la despolarización de la membrana hasta un valor medio de potencial de difusión de -94 ± 13 mV ($n=6$), mientras que la actividad citoplasmática de Na^+ disminuyó ligera aunque significativamente (t de Student $P<0,05$) desde 72 ± 5 mM hasta 65 ± 5 mM (Fig. 42).

Los resultados obtenidos no parecen indicar una implicación relevante de los mecanismos de transporte activo sobre la homeostasis citoplasmática de Na^+ .

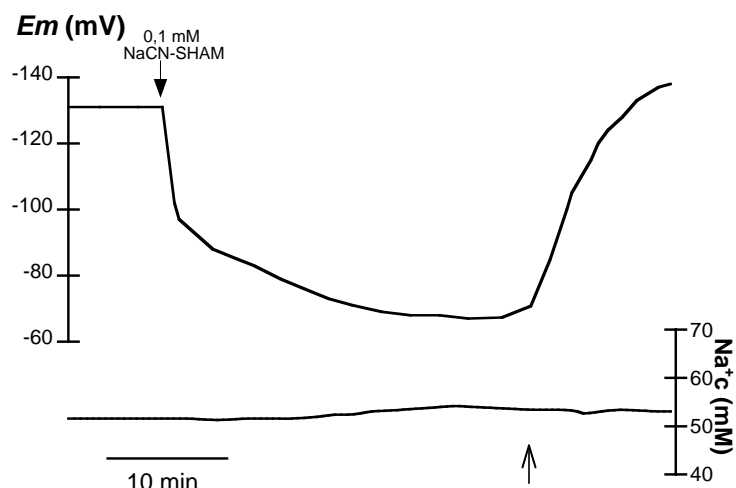


Figura 41. Efecto de la adición de inhibidores de la respiración sobre el E_m y la actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+_c) en células epidérmicas de la raíz de plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia de NaCl . Se muestra un registro simultáneo del potencial de membrana (trazo superior) y de la actividad citoplasmática de Na^+ (trazo inferior). Las medidas se realizaron en 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris Propano (pH 7,3) en presencia de 60 mM de NaCl . La flecha superior indica el momento de la adición de los inhibidores de la respiración y la flecha inferior indica el momento de la restauración del medio inicial. Se trata de un registro representativo de 5 experimentos independientes.

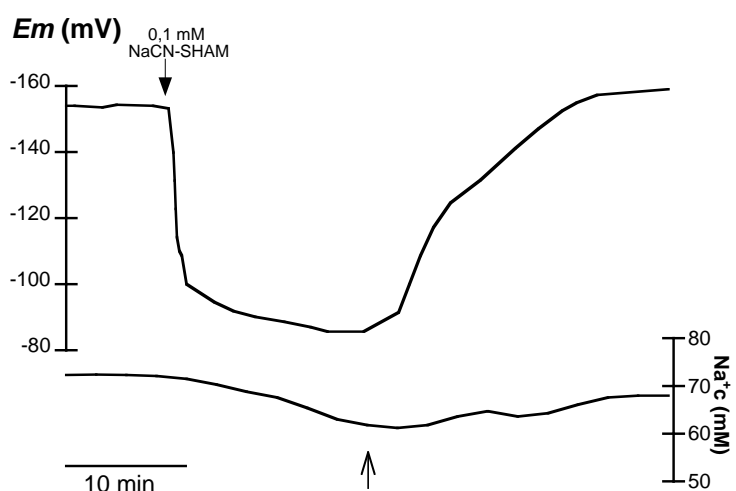


Figura 42. Efecto de la adición de inhibidores de la respiración sobre el E_m y la actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+_c) en células epidérmicas de la raíz de plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en presencia de 300 mM NaCl . Se muestra un registro simultáneo del potencial de membrana (trazo superior) y de la actividad citoplasmática de Na^+ (trazo inferior). Las medidas se realizaron en 2 mM CaCl_2 , 10 mM MES-Bis Tris Propano (pH: 7,3) en presencia de 300 mM NaCl . La flecha superior indica el momento de la adición de los inhibidores de la respiración y la flecha inferior indica el momento de la restauración del medio inicial. Se trata de un registro representativo de 5 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Transporte de K^+

Las raíces de *H. portulacoides* sometidas a deficiencia de K^+ y cultivadas en ausencia de Na^+ son capaces de incorporar K^+ en un medio con bajas concentraciones de este ión ($<250 \mu M K^+$) con una tasa inicial próxima a $4 \mu mol K^+ g_{pf Raiz}^{-1} h^{-1}$ (Fig. 9). Esta tasa se encuentra en el rango observado en la planta halófita *Spergularia marina* en la que se han observado valores que se sitúan entre 2 y $7,5 \mu mol K^+ g_{pf raiz}^{-1} h^{-1}$ (Wickens y Cheeseman, 1991). De hecho, las células de la raíz de *H. portulacoides* muestran una actividad transportadora de K^+ , analizada por electrofisiología, que se satura a una concentración externa entre 1-2 mM K^+ , mostrando una K_m en torno a $300 \mu M K^+$. Estas células tienen también la capacidad de transportar Rb^+ con una afinidad inferior que para K^+ , y tienen una capacidad muy limitada de transportar Cs^+ . De hecho, el ión Rb^+ muestra una inhibición competitiva con respecto al K^+ (Fig. 14) con una K_i en torno a $65 \mu M$, mientras que el ión Cs^+ no inhibe la incorporación de K^+ hasta que no alcanza concentraciones próximas a $250 \mu M$ (Fig. 16). Estas características son diferentes a las descritas para el transporte de K^+ de alta afinidad mediado por los transportadores HAK, que discriminan muy poco entre K^+ , Rb^+ y Cs^+ (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006).

Por otra parte, la presencia de Na^+ en el medio a concentraciones entre 25 y 100 mM Na^+ induce una ligera disminución de la capacidad máxima del transporte de K^+ (D_{max}) de entre un 15 a un 30 % y también aumenta la K_m (Tabla 3). Este efecto sobre la D_{max} es diferente a los resultados encontrados en raíces de la halófita *Suaeda salsa* (Mori *et al.*, 2011), donde no se observaron diferencias en la tasa de incorporación de K^+ en experimentos de depleción realizados a concentraciones crecientes de Na^+ en el rango 0-100 mM Na^+ . No obstante, sí se ha observado este efecto inhibitor del Na^+ en la incorporación de K^+ (a 25 mM) en el caso de *Atriplex nummularia* cultivada a 100 mM Na^+ (Ramos *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando la concentración externa de Na^+ alcanza 300 mM Na^+ , el efecto sobre la D_{max} es mucho mayor, ya que se reduce hasta un 70% con respecto al control. El efecto drástico de la adición de 300 mM Na^+ sobre la incorporación de K^+ se puede explicar en parte por la disminución en el potencial de membrana de las células, que no se observa a concentraciones más bajas de Na^+ (Tabla 3). Esta despolarización reduce el gradiente de potencial electroquímico para K^+ , lo que podría afectar el transporte pasivo de este ión.

La afinidad por K^+ observada en *H. portulacoides*, crecida en ausencia de K^+ y Na^+ , es menor que la que generalmente se indica para el transporte de K^+ de alta afinidad en las plantas (13-130 μM) (Maathuis y Sanders, 1996; Szczerba *et al.*, 2009). Sin embargo, la mayoría de las plantas analizadas en la literatura son glicófitas. Por lo que se sabe, la única K_m para K^+ que se conoce para una planta halófila es la de la especie *Thellungiella halophila*, que se sitúa en torno a 5 μM (Alemán *et al.*, 2009); no obstante, se ha discutido la relevancia de esta especie como modelo de una planta halófila (Flowers y Colmer, 2008).

Sin embargo, cuando las plantas se someten a deficiencia de K^+ pero se crecen en presencia de Na^+ , la K_m para K^+ aumenta hasta aproximadamente 800 μM K^+ en plantas cultivadas en 100 mM NaCl y hasta casi 2 mM de K^+ en plantas cultivadas en 300 mM NaCl (Fig. 18, Tabla 4), en presencia de las mismas concentraciones de Na^+ utilizadas para el crecimiento. Estos valores de K_m se sitúan claramente en el rango del transporte de baja afinidad para K^+ . *H. portulacoides* crece en un medio con una alta concentración de K^+ , que oscila entre 5 y 20 mM en el agua intersticial del sedimento donde se anclan las raíces (Rubio *et al.*, 2003; Palomo, 2004), así como en una alta concentración de Na^+ (por encima de 200 mM, Rubio *et al.*, 2003; Palomo, 2004). Por tanto, los valores de K_m observados en las plantas crecidas en ausencia de K^+ son inferiores a las concentraciones de K^+ existentes habitualmente en el medio ambiente de la planta. Sin embargo, parece que *H. portulacoides* ha conservado la capacidad de extraer K^+ a partir de un medio con concentraciones mucho más bajas que las que suelen estar presentes en su hábitat, por lo menos cuando se cultivan en ausencia de Na^+ .

La presencia de Na^+ en el medio de crecimiento reduce la D_{max} , si se compara con las plantas cultivadas en ausencia de este ión (Tabla 4). Este efecto es débil en 100 mM Na^+ y la reducción es del 17%, pero es mucho más acusado en 300 mM Na^+ , cuando la D_{max} disminuye un 50%. Sin embargo, este decremento es menor que el observado en plantas sometidas a 300 mM Na^+ , pero cultivadas en ausencia de dicho ión, cuya disminución fue de un 70%. Este efecto menor de la presencia de 300 mM Na^+ en el medio de crecimiento se puede explicar de nuevo porque el potencial de membrana de las células epidérmicas de la raíz de estas plantas es más negativo

(alrededor de -190 mV) que en las cultivadas en ausencia de Na^+ y expuestas a 300 mM Na^+ , cuyo potencial de membrana es próximo a -150 mV.

Las células de la raíz de plantas de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ muestran un potencial de membrana próximo a -200 mV. Este potencial es similar al observado en otra especie presente en la marisma del río Palmones, *Sarcornia perennis* (-200 \pm 6 mV, Palomo, 2004; Palomo *et al.*, 2005). Sin embargo, este potencial es más negativo que el observado en otras halófitas como *Atriplex hastata*, con valores alrededor de -130 mV (Anderson *et al.*, 1977); y que en *Atriplex lentiformis* y *Quenopodium quinoa*, cuyos valores son próximos a -140 mV en raíces de plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ (Bose *et al.*, 2015). Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que las plantas de estas tres especies no fueron cultivadas en ayuno de K^+ y que las células en deficiencia de K^+ están hiperpolarizadas (Maathuis y Sanders, 1994). De hecho, cuando *H. portulacoides* se cultiva en una solución de Hoagland diluida, con una concentración de K^+ en torno a 5 mM K^+ , las células de la raíz muestran unos potenciales de membrana próximos -140 mV (datos no mostrados). Por otra parte, el potencial de membrana de células de la raíz *H. portulacoides* apenas cambia cuando se someten las células a concentraciones milimolares de Na^+ de hasta 100 mM, y sólo se observa una mayor despolarización, llegando a unos -150 mV, cuando las células se someten a una concentración de 300 mM Na^+ (Tabla 3). Sin embargo, cuando las plantas se cultivan unos días en alta salinidad el potencial de membrana se mantiene en valores muy negativos incluso en presencia de 300 mM Na^+ (Tabla 4). Esta respuesta también se encontró en *A. hastata*, que se cultivó en presencia de hasta 600 mM Na^+ sin que se observara ningún cambio en el potencial de membrana de las células de la raíz (Anderson *et al.*, 1977).

Uno de los efectos negativos de las altas concentraciones externas de Na^+ en las plantas glicófitas es que induce una despolarización de las células que, a su vez, reduce la incorporación de K^+ (Amtmann y Beilby, 2010). Así, en la especie *T. halophila*, que es tolerante a la sal, la presencia de Na^+ induce una despolarización menor que en la glicófitas *Arabidopsis thaliana* (Volkov y Amtmann, 2006). Además, *T. halophila* es capaz de mantener un potencial de membrana altamente negativo cuando el tratamiento salino se prolonga en el tiempo. El mantenimiento de un potencial de membrana altamente negativo en las células sometidas a altas concentraciones de Na^+ permite

mantener una fuerza motriz elevada para la absorción de nutrientes (Volkov y Amtmann, 2006), incluyendo la incorporación de K^+ , y esto podría ser una ventaja para las plantas que viven en un entorno de salinidad alta (Shabala y Mackay, 2011). Los resultados observados en este trabajo para *H. portulacoides* y los reportados previamente en *A. hastata* y *S. perennis* sugieren que esto podría ser una característica clave para el éxito de las especies halófitas en un ambiente salino. De hecho, en un trabajo reciente se ha demostrado que el mantenimiento del potencial de membrana en presencia de Na^+ en dos especies de halófitas, *Atriplex lentiformis* y *Chenopodium quinoa*, se debe no a un mayor nivel de expresión del gen que codifica para la protón-ATPasa de la membrana en las células radicales, sino a la capacidad de la célula para regular su actividad, que aumenta al recibir un tratamiento salino (Bose *et al.*, 2015).

El efecto de diferentes inhibidores del transporte de K^+ se ha utilizado para determinar qué sistemas están implicados en la incorporación de K^+ en glicófitas (Rubio *et al.*, 2010). Se sabe que los iones Ba^{2+} y Cs^+ inhiben la incorporación de K^+ a través de la mayoría de los canales y algunos otros transportadores, mientras que el TEA^+ se considera un bloqueante específico de canales de K^+ dependientes del voltaje (Hedrich y Schroeder, 1989; Tester, 1990; Hille, 1992). Por otro lado, se ha demostrado que el ión NH_4^+ inhibe el transporte de K^+ a través de los transportadores de tipo HAK (Santa-María *et al.*, 2000). Así, se ha descrito en *Arabidopsis* que la incorporación de K^+ mediada por los transportadores de tipo HAK1 es sensible a NH_4^+ , Cs^+ y Na^+ , mientras que el transporte a través de canales de tipo AKT1 es insensible a NH_4^+ y Na^+ , pero sensible a Ba^{2+} y Cs^+ (Rubio *et al.*, 2010).

Los efectos producidos por los inhibidores del transporte de K^+ mencionados, que fueron similares en plantas cultivadas en ausencia o presencia de Na^+ , indican que el transporte de K^+ en *H. portulacoides* se produciría principalmente por canales (más probablemente de tipo AKT1) a todas las concentraciones de Na^+ utilizadas para el crecimiento. Así, el transporte de K^+ en *H. portulacoides* es insensible a la presencia de 5 mM TEA^+ , pero sensible a la presencia de 500 μM Cs^+ o 5 mM Ba^{2+} en todas las concentraciones de Na^+ analizadas (Figura 22). La inhibición fue casi completa en el caso del ion Ba^{2+} , mientras que el Cs^+ inhibió el transporte de K^+ un 70 %. Los efectos de Ba^{2+} y Cs^+ observados en *H. portulacoides* concuerdan con la inhibición del transporte de K^+ mediado por canales de tipo AKT1 encontrada en *A. thaliana* (Rubio *et*

al., 2010). Sin embargo, aunque el TEA^+ ha sido descrito como un inhibidor de canales de K^+ dependientes de voltaje, no se detectó inhibición de la incorporación de K^+ en presencia de este compuesto. No obstante, los efectos de TEA^+ , Ba^{2+} y Cs^+ en *H. portulacoides* son bastante similares a los resultados observados en levaduras que expresaban canales de tipo AKT1 (Bertl *et al.*, 1997). Así, en levadura transformada con AKT1, el transporte de K^+ fue ligeramente inhibido por 10 mM TEA^+ , fuertemente inhibido por 3 mM Ba^{2+} y aún más drásticamente inhibido por 100 μM Cs^+ . Sin embargo, en el caso de *H. portulacoides*, el efecto de Cs^+ no es tan fuerte. De hecho, en plantas cultivadas en ausencia de Na^+ , la presencia de 100 μM Cs^+ apenas afectó a las despolarizaciones inducidas por K^+ (Figura 16). Por otra parte, los efectos de TEA^+ y Cs^+ sobre el transporte de K^+ en *H. portulacoides* son similares a los descritos para la incorporación de K^+ por la raíz en la halófito *Puccinellia tenuiflora* (Peng *et al.*, 2004).

Otra característica que distingue los transportadores de K^+ de los canales de K^+ es que la presencia de NH_4^+ afecta el transporte de K^+ mediado por los transportadores de tipo HAK pero no el transporte a través de los canales de tipo AKT (Santa-María *et al.*, 2000; Szczerba *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2008; Alemán *et al.*, 2011). Así, cuando las plantas se cultivaron en presencia de 1 mM de NH_4^+ en 300 mM Na^+ , la incorporación de K^+ fue similar a la de las plantas control cultivadas sin NH_4^+ (Fig. 26). Sin embargo, cuando las plantas se cultivaron en presencia de NH_4^+ , pero en ausencia de Na^+ , el transporte de K^+ se redujo en aproximadamente un 30% con respecto al control (Fig. 25). No obstante, esta disminución fue menor que la observada para la incorporación de K^+ en plantas de tomate cultivadas en 1,5 mM NH_4^+ y en ausencia de K^+ . Así, cuando estas plantas fueron sometidas a experimentos de depleción de K^+ en presencia de 1 mM de NH_4Cl , el transporte de K^+ se inhibió un 70% (Nieves-Cordones *et al.*, 2007). Una inhibición similar y drástica del ión NH_4^+ se encontró también en la planta tolerante a la sal *T. halophila* (Alemán *et al.*, 2009) en la que, como en el tomate, la incorporación de alta afinidad de K^+ está mediada por transportadores de tipo HAK (Nieves-Cordones *et al.*, 2007; Alemán *et al.*, 2009). El hecho de que el transporte de K^+ en *H. portulacoides* no sea inhibido por la presencia de NH_4^+ a concentraciones altas de Na^+ es de gran importancia dado que el estuario del río Palmones es un medio altamente salino donde el amonio puede alcanzar concentraciones próximas a 1,5 mM (Rubio *et al.*, 2003; Palomo, 2004).

La inhibición del transporte de K^+ observada en presencia de Ba^{2+} y Cs^+ , junto con la falta de efecto del NH_4^+ sugiere que, a alta salinidad, el transporte de K^+ en *H. portulacoides* no se produciría a través de transportadores de alta afinidad de tipo HAK, sino principalmente por canales (muy probablemente del tipo AKT). La misma conclusión se podría aplicar a las plantas cultivadas en ausencia de Na^+ , sin embargo, la ligera inhibición tanto por Na^+ como por NH_4^+ observada en este caso, sugiere que los transportadores de tipo HAK podrían contribuir parcialmente al transporte de K^+ . Sin embargo, se ha de tener en cuenta que la regulación y las características de los transportadores de K^+ podrían ser diferentes en halófitas y glicófitas. Así, la actividad de los transportadores de tipo HAK de la halófito *M. crystalinum* no se ve afectada por la presencia de 150 mM Na^+ cuando se expresan en levadura (Sue *et al.*, 2002), una característica que no se observa en transportadores HAK de plantas glicófitas, que sí son inhibidos por Na^+ (Santa-María *et al.*, 1997; Nieves-Cordones *et al.*, 2007). Resultados similares se han observado en la halófito marina *Cymodocea nodosa*, pues el transporte de K^+ en levadura transformada con *CnHAK* no fue inhibido por Na^+ (Garcia-deblás *et al.*, 2002); o en la planta *T. halophila*, tolerante a la salinidad, en la que la expresión de *ThHAK5* se ve menos afectada por los tratamientos de NaCl que la de su homólogo *AtHAK5* en *A. thaliana* (Alemán *et al.*, 2009). Además, la expresión de varios HAKs de *M. crystalinum* se incrementó en alta salinidad a pesar de la presencia de K^+ en el medio (Sue *et al.*, 2002), siendo ésta otra diferencia con respecto a la regulación de los HAKs de glicófitas. Por otro lado, plantas de *M. crystalinum* sometidas a 400 mM Na^+ mostraron una disminución en la expresión de MKT1 (un canal de K^+ de la familia AKT), pero mostraron un aumento en la expresión de los genes *McHAK* y *McHKT* en raíces (Sue *et al.*, 2001, 2003). El aumento de la expresión de *McHAKs* a concentraciones altas de Na^+ , además de la falta de inhibición por Na^+ , llevaron a proponer que *McHAKs*, y no los canales MKT1, estarían involucrados en la incorporación de K^+ en esta planta a alta salinidad (Sue *et al.*, 2002). Por otra parte, en la especie tolerante a la salinidad *Thellungiella salsuginea*, el transportador *TsHKT1;2* se sobreexpresa en estrés salino y muestra una gran actividad transportadora de K^+ y una alta selectividad para K^+ frente a Na^+ cuando se expresa en células de levadura (Ali *et al.*, 2012); siendo estas características diferentes a la de algunos de los genes *HKTs* analizados en glicófitas (Horie *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta el momento, los transportadores de tipo HKT sólo se han implicado en el transporte de Na^+ de baja afinidad en halófitas (Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013), no en el transporte de K^+ .

Otra evidencia a favor de que la incorporación de K^+ en *H. portulacoides* se produce principalmente a través de canales está relacionada con el mecanismo de transporte. La medida de la actividad citoplasmática de K^+ permite el cálculo del gradiente del potencial electroquímico para K^+ y, por tanto, distinguir entre transporte activo y pasivo. Así, los valores del gradiente de potencial electroquímico para K^+ que se han calculado indican que el transporte de K^+ podría ser pasivo, es decir, mediado por canales, incluso a muy bajas concentraciones micromolares de K^+ (Fig. 27). En plantas crecidas en 300 mM Na^+ , el transporte pasivo sería posible a concentraciones superiores a 120 $\mu M K^+$. De hecho, cuando las plantas se cultivan en 300 mM Na^+ , la adición de K^+ a concentraciones inferiores a 200 $\mu M K^+$ en un medio que contiene 300 mM Na^+ induce una despolarización media de 1 mV en células radiculares, lo que indica un mínimo transporte de K^+ . Es decir, el transporte de K^+ se llevaría a cabo a través de canales a altas concentraciones externas de Na^+ . Por otro lado, el gradiente de potencial electroquímico para K^+ en células radiculares de plantas de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia de Na^+ indica que el transporte de K^+ sería pasivo a concentraciones superiores a 20 $\mu M K^+$, es decir, que podría darse a través de canales. De hecho, el efecto del pH externo también apoya esta idea. Así, se esperaría un efecto de la concentración externa de protones si el transporte de K^+ fuera dependiente de este catión, como se ha propuesto para los transportadores de tipo HAK (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Sin embargo, el pH externo no afectó al transporte de K^+ (a 1 mM K^+) tanto en plantas cultivadas en ausencia o en presencia de Na^+ (Fig. 23). No obstante, las despolarizaciones inducidas por concentraciones de K^+ en el rango de 10-20 μM (entre 2 y 7 mV) en células radiculares de plantas cultivadas sin Na^+ indican la existencia de un transporte de K^+ a estas bajas concentraciones. En este caso, sólo un transportador activo podría conducir el transporte, por lo que la contribución de un transportador de tipo HAK en estas condiciones no puede ser excluida.

IV.2. Transporte de Na^+

Las raíces de plantas de *H. portulacoides* sometidas a deficiencia de Na^+ y K^+ son capaces de incorporar Na^+ de un medio con concentraciones de Na^+ en el orden micromolar ($< 500 \mu M$) con una tasa inicial de $9,6 \pm 1,9 \mu mol \text{ de } Na^+ \text{ g } PF_{raiz}^{-1} h^{-1}$ (Fig. 28). Esta tasa es de similar magnitud que el flujo neto de Na^+ observado en las halófitas *Suaeda maritima* ($12 \mu mol \text{ Na}^+ \text{ g } PF_{raiz}^{-1} h^{-1}$, Wang *et al.*, 2007) y *Atriplex nummularia* ($9,7 \mu mol \text{ Na}^+ \text{ g } PF_{raiz}^{-1} h^{-1}$, Mills *et al.*, 1985); aunque, en esos casos, las

concentraciones externas de Na^+ fueron 25 mM y 50 mM, respectivamente. Por otro lado, la velocidad inicial de incorporación de Na^+ observada en *H. portulacoides* fue de magnitud similar al valor máximo descrito para la incorporación de sodio de alta afinidad, a una concentración saturante de 0,2 mM Na^+ en cebada (en torno a $8 \mu\text{mol g PF}^{-1} \text{h}^{-1}$), que es una planta glicófita que muestra transporte de sodio de alta afinidad (Rains y Epstein, 1967; Schulze *et al.*, 2012). Es decir, parece entonces que la halófita *H. portulacoides* tiene una capacidad similar, pero no mayor, que las plantas glicófitas para incorporar sodio en el rango micromolar.

El valor obtenido para la incorporación de Na^+ es mayor que el observado para la tasa inicial de incorporación de K^+ en esta especie, que fue $4,27 \pm 1,7 \text{ mol K}^+ \text{ g PF raiz}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Ait Hammou *et al.*, 2014). Sin embargo, en este caso, la concentración inicial fue de 250 $\mu\text{M K}^+$, de modo que se esperarían obtener tasas más altas a concentraciones externas de K^+ más elevadas. No se han encontrado datos en la literatura sobre incorporación de Na^+ en halófitos a concentraciones micromolares de Na^+ . No obstante, sí se han realizado experimentos de depleción de Na^+ y K^+ a una concentración inicial de iones de 1 mM, en raíces de plantas de *Suaeda salsa* cultivadas a una concentración baja de K^+ (0,2 mM) y en ausencia de sodio (Mori *et al.*, 2011). Pero dado que no se indicó en este trabajo el peso de las raíces utilizadas en los experimentos de depleción, no se pueden comparar los datos de *H. portulacoides* con los de *S. salsa*. Sin embargo, tal y como se ha observado en *H. portulacoides*, las tasas de incorporación de Na^+ y K^+ en *S. salsa* fueron de magnitud similar, aunque las tasas de incorporación de K^+ fueron aproximadamente el doble que las de incorporación de Na^+ (Mori *et al.*, 2011). Tasas de incorporación de Na^+ y K^+ de alta afinidad de magnitud similar también se han observado en especies glicófitas (Rains y Epstein, 1967; Garciadeblás *et al.*, 2003; Schulze *et al.*, 2012).

En los experimentos de depleción, la concentración externa de Na^+ se estabilizó a aproximadamente 280 μM después de 15 horas de incubación. Esto podría ser una indicación del límite de incorporación de Na^+ para esta especie. Sin embargo, los datos obtenidos a partir del estudio del transporte de Na^+ mediante las medidas de potencial de membrana en células radiculares, indicaron que éstas tienen la capacidad para transportar Na^+ dentro de la célula a concentraciones mucho más bajas. De hecho, la adición de sólo 10 $\mu\text{M Na}^+$ indujo una ligera despolarización de la membrana, que

puede estar relacionada con la entrada de cargas positivas, esto es, de iones Na^+ . El ajuste de los valores de despolarización obtenidos a concentraciones crecientes de Na^+ al modelo de Michaelis-Menten dio lugar a un valor de K_m próxima a $600 \mu\text{M}$ Na^+ (Fig. 30), de magnitud similar al valor de K_m para el transporte de K^+ en la misma especie (aprox. $300 \mu\text{M}$; Ait Hammou *et al.*, 2014), pero que dobla su valor. Este valor de K_m para el Na^+ está lejos de los valores de K_m descritos para el transporte de sodio de alta afinidad en especies glicófitas ($15\text{-}60 \mu\text{M}$; Garcíadeblás *et al.*, 2003) donde se ha demostrado la implicación de un transportador tipo HKT (Garcíadeblás *et al.*, 2003; Haro *et al.*, 2005; Horie *et al.*, 2007). Sin embargo, se han encontrado valores de K_m más altos para la incorporación de Na^+ en el briófito *Physcomitrella patens* ($120 \mu\text{M}$), donde se ha propuesto la implicación de un transportador diferente a HKT para el transporte de alta afinidad de Na^+ (Haro *et al.*, 2010). Del mismo modo, la K_m para K^+ en *H. portulacoides* es mucho mayor que la descrita para el transporte de alta afinidad de potasio en glicófitas ($13\text{-}130 \mu\text{M}$; Maathuis y Sanders., 1996; Szczerba *et al.*, 2009). Sin embargo, los valores de K_m para Na^+ y K^+ son muy inferiores a las concentraciones habituales de Na^+ y K^+ en el medio ambiente de la planta. Así, parece que, como en el caso del K^+ (Ait Hammou *et al.*, 2014), *H. portulacoides* ha conservado la capacidad de extraer Na^+ a concentraciones mucho más bajas que las que habitualmente están presentes en su medio natural. De hecho, esta capacidad no se ha encontrado en otra especie halófito presente en el mismo estuario, *Sarcocornia perennis*, utilizando las mismas técnicas electrofisiológicas y condiciones de cultivo (Elena *et al.*, 2009). Esta diferencia podría estar relacionada con las diferentes estrategias para hacer frente a los ambientes salinos, ya que *H. portulacoides* es una especie inclusora que presenta vesículas de sal en sus hojas, mientras que *S. perennis* es una halófila suculenta que carece de dichas estructuras.

El valor máximo de la despolarización inducida por Na^+ fue de alrededor de 70 mV , mientras que en el caso de K^+ fue de en torno a 80 mV . Aunque no hubo mucha diferencia entre las despolarizaciones máximas, obtenidas en el ajuste al modelo de Michaelis-Menten, los valores de las despolarizaciones inducidas por Na^+ fueron siempre inferiores a las inducidas por K^+ a la misma concentración (por ejemplo, para una concentración del ión de $1000 \mu\text{M}$, $46 \pm 2 \text{ mV}$ y $61 \pm 7 \text{ mV}$, inducidas por Na^+ y K^+ , respectivamente). Esto indica una capacidad ligeramente menor para el transporte de Na^+ que para el transporte de K^+ hacia el interior de la célula en el rango micromolar.

Debido a las características cinéticas y las tasas de incorporación similares, la pregunta que se plantea es si el transporte de Na^+ es diferente al transporte de K^+ , es decir, si está mediado por los mismos o por diferentes sistemas de transporte. Los diferentes efectos de Rb^+ y Cs^+ , que inhiben claramente el transporte de K^+ , pero no afectan al transporte de Na^+ , indican que el transporte de Na^+ es diferente al transporte de K^+ , como se ha demostrado para el transporte de alta afinidad de Na^+ y K^+ en glicófitas (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Estos resultados también sugieren que el transporte de Na^+ no podría estar mediado por canales de tipo AKT1, ya que estos se han propuesto como vía mayoritaria de entrada de K^+ en esta especie (Ait Hammou *et al.*, 2014). Por otra parte, el ión Ba^{2+} inhibió tanto el transporte de Na^+ como de K^+ , sin embargo, la inhibición fue mucho mayor en el caso del transporte de K^+ , que prácticamente se suprimió, mientras que la inhibición del transporte de Na^+ fue de alrededor de 30%, lo que indica una vez más la diferencia entre los mecanismos de transporte de estos iones.

Se sabe que el Ba^{2+} inhibe el transporte de sodio de alta afinidad a través de los transportadores de tipo HKT, así que esto podría ser una indicación de la implicación de este transportador en la entrada de Na^+ al interior celular en *H. portulacoides*. Pero, por otra parte, una de las características del transporte de alta afinidad para Na^+ mediado por HKT es que sólo se observa cuando las plantas se cultivan en ausencia de Na^+ y K^+ . De hecho, la incorporación de alta afinidad de Na^+ sólo se produce cuando se agota el K^+ en el medio (Garcíadeblás *et al.*, 2003; Haro *et al.*, 2010). En el caso de *H. portulacoides* la presencia de sodio en el medio de cultivo no inhibió el transporte de Na^+ (Fig. 32). Y, aunque la presencia de K^+ inhibió parcialmente el transporte de sodio, éste se mantuvo a una tasa considerable (Fig. 33). Este resultado también se ha observado en el caso del briófito *Physcomitrella patens*, en el que la presencia de 200 μM K^+ sólo inhibió un 30% la incorporación de Na^+ ; así, se ha propuesto que un transportador distinto a HKT estaría implicado en el transporte de sodio de alta afinidad en esta especie (Haro *et al.*, 2010). Estos resultados indican que un transportador HKT, del tipo utilizado para el transporte de sodio de alta afinidad en algunas glicófitas, no podría estar implicado en el transporte de Na^+ en *H. portulacoides*. De hecho, la función fisiológica propuesta para estos transportadores HKT es incorporar Na^+ cuando el medio externo carece de K^+ , de modo que el ión Na^+ pueda sustituir al K^+ en algunas funciones fisiológicas (Rodríguez-Navarro *et al.* 2006, Horie *et al.* 2007), situación que

no ocurre en el medio donde vive *H. portulacoides*. Sin embargo, se ha propuesto que transportadores de tipo HKT podrían estar involucrados en la incorporación de Na^+ de baja afinidad en halófitas. En concreto, se ha observado en *S. maritima* que, a concentraciones externas de 25 mM Na^+ , el transporte de Na^+ se inhibía un 36% por Ba^{2+} (Wang *et al.*, 2007), un porcentaje similar al observado en *H. portulacoides* (31%). Ello sugiere que transportadores de tipo HKT, de la familia que se ha relacionado en el transporte de Na^+ de baja afinidad, podrían estar involucrados en la incorporación de Na^+ en *H. portulacoides*.

Otros sistemas de transporte que se han relacionado con la entrada Na^+ son los canales LCT1 y NSCC independientes del voltaje (VI-NSCC), que se ha demostrado que son inhibidos por Ca^{2+} (Amtmann *et al.*, 2001). Sin embargo, en el caso de *H. portulacoides* no se detectó ninguna inhibición del transporte de Na^+ cuando la concentración de Ca^{2+} aumentó de 2 a 10 mM (Fig. 34). Este mismo resultado también se ha observado en la incorporación de Na^+ de baja afinidad, tanto a concentraciones externas de 25 y 150 mM, en la halófito *S. maritima* (Wang *et al.* 2007). La falta de inhibición del Ca^{2+} parece entonces excluir la participación de LCT1 y VI-NSCC en la entrada de Na^+ en *H. portulacoides*; sin embargo, se ha de tener en cuenta que esta especie se desarrolla en un medio donde la concentración de Ca^{2+} es siempre alta y que estos canales, si están presentes en esta especie, podrían estar regulados de manera diferente, como se ha propuesto para otros sistemas de transporte de Na^+ y K^+ en halófitas (Flowers y Colmer, 2008). Por otro lado, los VI-NSCC no se ven afectados por Cs^+ y Li^+ , y una clase de VI-NSCC también puede ser parcialmente bloqueada por Ba^{2+} (Demidchick y Maathuis, 2007), resultados que se han encontrado en las despolarizaciones inducidas por Na^+ en *H. portulacoides*. Parece entonces difícil establecer qué sistema estaría implicado en el transporte de Na^+ en *H. portulacoides*, como se ha observado en el caso del transporte de Na^+ en cebada utilizando sólo un análisis farmacológico (Schulze *et al.*, 2012).

Los valores de actividad citosólica de Na^+ medidos en células de la raíz (26 ± 3 mM) indican que el transporte de Na^+ por encima de 10 μM Na^+ sería pasivo, como se ha demostrado también para concentraciones micromolares de K^+ (Ait Hammou *et al.*, 2014), es decir, tendría que estar mediado por canales. Sin embargo, este dato no puede

excluir totalmente la participación de los transportadores de tipo HKT, ya que es muy probable que éstos funcionen como canales (Benito *et al.*, 2014).

IV.3. Homeostasis citoplasmática de K^+ y Na^+

Tal como se ha descrito para halófitas dicotiledóneas (Flowers y Colmer, 2008), las plántulas de *H. portulacoides* muestran un mayor crecimiento cuando se cultivan en presencia de elevadas concentraciones de NaCl. Así, el crecimiento en ausencia de Na^+ fue la mitad del observado tras 7 días de cultivo en presencia de 150 ó 300 mM NaCl (Figura 40). Estos resultados son similares a los descritos por Redondo y colaboradores (2007) para esta misma especie. Estos autores observaron como la tasa de crecimiento de plantas de tres meses se duplicaba tras 60 días de cultivo en presencia de 200 mM NaCl, respecto a condiciones sin tratamiento salino. No obstante, tal como se había descrito anteriormente (Jensen, 1985), la tasa de crecimiento relativa de dichas plantas mostraba una reducción drástica cuando se cultivaban en presencia de concentraciones superiores de sal (de 400 a 700 mM NaCl), sugiriendo que la salinidad óptima para el crecimiento de plantas de *H. portulacoides* estaría en torno a 200 mM NaCl (Jensen, 1985; Redondo *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las plántulas procedentes de la germinación de semillas de *H. portulacoides* pueden tolerar concentraciones algo mayores de NaCl, sin que se afecte su crecimiento en presencia de 300 mM NaCl. Este valor es superior al descrito para otras halófitas del mismo género como *Atriplex amnicola*, cuyo crecimiento disminuye a concentraciones mayores de 50 mM (Aslam *et al.*, 1986) o *Atriplex nummuralia* cuyo crecimiento se inhibe por encima de 100 mM NaCl (Ashy y Beadle, 1957; Khan *et al.*, 2000) y *Atriplex. griffithii* va. *stocksii* que muestra una reducción del crecimiento de la raíz por encima de 90 mM NaCl (Ramos *et al.*, 2004).

De manera general se ha propuesto que las halófitas utilizan la acumulación controlada y el secuestro de iones inorgánicos como mecanismo básico para ajustar su potencial osmótico y permitir la incorporación de agua por las raíces en medios con salinidad extrema (Munns, 2002). Así, se ha relacionado el grado diferencial de tolerancia a la salinidad con la capacidad para acumular iones involucrados en el ajuste osmótico (Flowers y Yeo, 1986; Munns y Tester, 2008). En trabajos previos con esta especie, se observó que en raíces de plantas de *H. portulacoides* de tres meses cultivadas 60 días a salinidad creciente, se producía un incremento del contenido total

de Na^+ , mientras que el contenido total de K^+ permanecía constante. Ello daba lugar a un incremento de la relación Na^+/K^+ de 1,5 veces en plantas cultivadas en presencia de 300 mM NaCl respecto al de las plantas cultivadas en ausencia de sal (Redondo *et al.*, 2007). Sin embargo, en el caso de la raíz de plántulas, los resultados obtenidos en este trabajo muestran un incremento mayor del contenido total de Na^+ tras 7 días en presencia de 300 mM NaCl respecto al contenido total de K^+ , que se reduce a la mitad, dando lugar a un incremento de la relación Na^+/K^+ de unas 14 veces respecto al valor obtenido en ausencia de sal (Tabla 14). Este comportamiento diferente respecto a la relación Na^+/K^+ y al mantenimiento del contenido total de K^+ entre plantas de tres meses y plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en presencia de elevadas concentraciones de sal podría explicarse como un mecanismo de ajuste osmótico en respuesta a la salinidad durante el crecimiento de las plántulas. Así, durante los primeros estadios de crecimiento en presencia de altas concentraciones de Na^+ las plántulas acumularían más Na^+ que K^+ , cuya disponibilidad en el medio sería menor, permitiendo la incorporación de agua, esencial para la elongación celular en esa fase del crecimiento. Una respuesta iónica similar ha sido descrita para las hojas de *Chenopodium quinoa* cultivada en salinidades crecientes (de 0 a 300 mM NaCl), en las que la relación Na^+/K^+ aumenta 20 veces en hojas maduras, mientras que en hojas jóvenes el incremento de dicha relación es superior a 300 veces (Hariadi *et al.*, 2011). Así también en el caso de *H. portulacoides* se ha observado un incremento de la relación Na^+/K^+ en cotiledones (Tabla 14), que es 70 veces mayor que el observado en plántulas crecidas en ausencia de sal.

La acumulación de Na^+ y Cl^- , y por tanto el aumento de la relación Na^+ respecto a K^+ , ha sido propuesta como un mecanismo de ajuste osmótico para algunas halófitas, particularmente las Chenopodiaceas, calificadas como especies inclusoras (Flowers y Colmer, 2008) frente a otras halófitas, generalmente monocotiledóneas, que restringen la entrada de Na^+ a través de la raíz mediante una alta selectividad en la incorporación de K^+ frente a Na^+ . En estas especies, como las halófitas monocotiledóneas *Puccinellia peisonis* o *Festuca rubra* (Marschner, 2012), la exclusión de sales contribuiría a la tolerancia a la salinidad, siendo ésta también una característica de especies glicófitas más tolerantes a medios salinos (Greenway y Munns, 1980; Shabala *et al.*, 2014). No obstante, en realidad existe un continuo de diferentes grados de exclusión o inclusión, que difieren entre Na^+ y Cl^- , y entre partes y órganos de la planta (Marschner, 2012). En

el caso de las especies incluseras, la presencia de glándulas y vesículas de sal, como las observadas en el género *Atriplex* (Schirmer y Breckle, 1982), funcionaría como un mecanismo eficiente para la excreción o secuestro del exceso de Na^+ acumulado (Shabala *et al.*, 2013). Sin embargo, la información sobre los mecanismos de incorporación y homeostasis de Na^+ en las raíces de halófitos es muy escasa (Flowers y Colmer, 2008). En el caso de *H. portulacoides* los valores de permeabilidad relativa Na^+/K^+ de la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz indican que las raíces de esta especie serían muy permeables a Na^+ . De hecho, en medidas de Na^+_c realizadas en continuo en plántulas crecidas en ausencia de Na^+ , se ha observado un incremento de casi el doble de la Na^+_c al pasar de concentraciones externas de 1 mM a 60 mM Na^+ . No obstante, el aumento de la permeabilidad relativa a K^+ respecto a Na^+ en plántulas cultivadas en 300 mM NaCl (Tabla 15) indica una selectividad próxima al 90% para los mecanismos de incorporación de K^+ frente a Na^+ en condiciones salinas. Ambas características coinciden con el carácter incluser (presencia de glándulas de sal) que presenta esta planta y con la capacidad para incorporar K^+ a concentraciones altas de Na^+ observada en esta especie.

Los valores de permeabilidad obtenidos en el caso de plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia de tratamiento salino ($P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+} = 0,52$) son similares a los descritos en la especie tolerante a la salinidad *Plantago maritima* ($P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+} \approx 0,6$) en condiciones de estrés moderado (25 mM NaCl; Maathuis y Prins, 1990). No obstante, el valor obtenido en las plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en presencia de 300 mM NaCl ($P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+} = 0,12$) es la mitad del descrito por esos mismos autores para la especie sensible a la salinidad, *Plantago media*, cultivada en presencia de 25 mM NaCl (Maathuis y Prins, 1990); precisamente, la sensibilidad de *P. media* se ha relacionado con la baja capacidad de excluir Na^+ (Maathuis y Prins, 1990). Por otra parte, los valores de permeabilidad relativa obtenidos en *H. portulacoides* son varios órdenes de magnitud superiores a los descritos en la fanerógama acuática *Zostera marina* que muestra, en agua de mar natural (500 mM NaCl), una permeabilidad muy restringida a Na^+ respecto a K^+ tanto en hojas ($P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+} = 0,003$; Fernández *et al.*, 1999), como en raíces ($P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+} = 0,046$; Rubio, 2004). A diferencia de *H. portulacoides*, esta halófita monocotiledónea marina, tanto por sus valores de permeabilidad relativa como por la presencia de un antiportador Na^+/H^+ en el plasmalema (Rubio *et al.*, 2011), presentaría una adaptación al medio salino de tipo

exclutor. Asimismo, la alta permeabilidad al Na^+ observada en las células epidérmicas de la raíz de *H. portulacoides* también es mayor que la observada en otra especie procedente de la marisma del estuario del Río Palmones, *Sarcocornia perennis*, cuya permeabilidad relativa a Na^+ respecto a K^+ , en células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en ausencia o en presencia de 300 mM NaCl, es 0,07 y 0,009, respectivamente (Elena *et al.*, 2009). No obstante, *S. perennis* no presenta glándulas de sal, pero sí muestra tallos de tipo suculento (Schirmer y Breckle, 1982), lo cual sugiere que posea mecanismos de tolerancia a la salinidad diferentes a los de *H. portulacoides*.

Un aspecto clave en el proceso de tolerancia a la salinidad es el mantenimiento de una relación Na^+/K^+ baja en el citoplasma debido a los efectos nocivos del Na^+ en los procesos metabólicos (Amtmann y Sanders, 1999; Munns y Tester, 2008). Así, la tolerancia a la salinidad se adquiere no sólo por la exclusión o compartimentación de Na^+ sino por la retención eficiente de K^+ en el citoplasma en condiciones de estrés salino (Shabala y Munns, 2012). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, la primera vez que se mide la actividad citoplasmática de Na^+ y K^+ en una halófito terrestre utilizando microelectrodos selectivos para iones, muestran que se produce una disminución de la concentración citoplasmática de K^+ en las células epidérmicas de la raíz de *H. portulacoides* cultivadas en tratamiento salino (Tabla 12). La actividad citoplasmática de K^+ en células radiculares de *H. portulacoides* sometidas a deficiencia de K^+ y Na^+ se encuentra en torno a 76 mM K^+ , un valor en el mismo rango que el observado en algunas glicófitas, como *Arabidopsis*, cebada y tomate, cultivadas en condiciones de K^+ limitantes (Walker *et al.*, 1996; Carden *et al.*, 2003; Leidi *et al.*, 2010; Barragán *et al.*, 2012; Huertas *et al.*, 2013), aunque se han observado valores incluso más bajos, alrededor de 40 mM, en plantas de cebada sometidas a ayuno extremo de K^+ (Walker *et al.*, 1996). Sin embargo, cuando las plántulas de *H. portulacoides* se cultivaron en presencia de 300 mM Na^+ , el K^+ citosólico disminuyó hasta valores en torno a 55 mM K^+ . Este resultado concuerda con la disminución del contenido total de K^+ , discutido anteriormente en el caso de las plántulas cultivadas en presencia de 300 mM NaCl respecto a las cultivadas en ausencia de Na^+ . Asimismo, la reducción del K^+ citosólico en presencia de una alta concentración externa de Na^+ también se ha observado en plantas glicófitas cultivadas a concentraciones por encima de 100 mM Na^+ , utilizando la misma técnica electrofisiológica (Carden *et al.*, 2003; Huertas *et al.*, 2013). Así, en el caso de una variedad de cebada sensible a la salinidad la

actividad citoplasmática de K^+ se reduce desde 60 mM hasta valores en torno a 39 mM tras 8 días de cultivo en 200 mM NaCl (Carden *et al.*, 2003). En el caso de tomate (*Solanum lycopersicum* cv *MicroTom*) la disminución de la actividad citoplasmática de K^+ es menor que la observada en *H. portulacoides*, habiéndose descrito una reducción de 75 a 68 mM K^+ en las células epidérmicas de la raíz de plántulas cultivadas en presencia de 120 mM NaCl (Huertas *et al.*, 2013). Parece entonces que los mecanismos de homeostasis del K^+ citosólico en *H. portulacoides* tendrían un comportamiento parecido al observado en glicófitas. Por otra parte, los valores de actividad citoplasmática de K^+ detectados en las plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en condiciones salinas son menores a los estimados por otros métodos en células radiculares de otras especies del mismo género, en las que se ha descrito que la concentración de K^+ oscilaría entre 120 y 225 mM en plantas crecidas entre 50 y 600 mM NaCl (Flowers *et al.*, 2015).

Aunque la disminución del K^+ citosólico observada en *H. portulacoides* parece estar en contra de una eficiente capacidad para retener K^+ en el citoplasma propuesta como mecanismo de tolerancia a la salinidad (Shabala y Munns, 2012), en el caso de *H. portulacoides* esta disminución del K^+ citoplasmático, dado que al mismo tiempo se produce una despolarización de la membrana, determina que el valor del gradiente de potencial electroquímico para K^+ (Fig. 27), permita impulsar la entrada pasiva de K^+ desde concentraciones externas en torno a 0,1 mM K^+ . Estos resultados están en la misma línea que los descritos en el caso de plantas de tomate transformadas que sobreexpresan el antiportador LeNHX2 (Huertas *et al.*, 2013), las cuales muestran una reducción a la mitad de la actividad citoplasmática de K^+ (36 mM), pero mantienen un mayor transporte de K^+ en condiciones de estrés salino respecto a las plantas no transformadas (Huertas *et al.*, 2013). En este sentido, la mayor tolerancia a la salinidad podría explicarse por el mantenimiento de condiciones termodinámicas que garanticen la incorporación de K^+ en presencia de elevadas concentraciones de Na^+ , tal como indican los resultados obtenidos en las plántulas de *H. portulacoides*.

En relación con las condiciones termodinámicas un aspecto destacable observado en las células epidérmicas de la raíz de *H. portulacoides*, mencionado anteriormente, es el mantenimiento de un potencial de membrana muy negativo en presencia de 300 mM NaCl, en torno a -160 mV. Este valor es similar al descrito en la

fanerógama acuática *Z. marina* (en torno a -156 mV) medido en agua de mar natural con una concentración de 500 mM NaCl (Fernández *et al.*, 1999). Parece por tanto, que en el caso de las células epidérmicas de la raíz de *H. portulacoides*, a pesar de que la presencia de elevadas concentraciones de Na⁺ despolariza parcialmente la membrana, disminuyendo la capacidad para incorporar K⁺ en presencia de 300 mM Na⁺, como se ha discutido anteriormente, el gradiente de potencial electroquímico que impulsa la entrada pasiva de este ión puede ser suficiente para mantener la incorporación pasiva de K⁺ en condiciones parecidas a las del estuario.

El incremento de los contenidos totales de Na⁺ observado en las plántulas cultivadas en presencia de 300 mM NaCl, así como la elevada permeabilidad relativa Na⁺/K⁺ estimada en las células radiculares, se corresponde con la mayor actividad citoplasmática de Na⁺ medida en las células epidérmicas de la raíz cultivadas en presencia de 300 mM NaCl (72 mM Na⁺c), respecto al valor obtenido en las plántulas cultivadas en ausencia de tratamiento salino (26 mM Na⁺c). En ambos tratamientos la actividad citoplasmática de Na⁺ es mayor que la que se ha detectado en *Z. marina*, utilizando las mismas técnicas electrofisiológicas, tanto en las células de la raíz (alrededor de 11 mM, Rubio *et al.*, 2005) como del mesófilo foliar (en torno a 13 mM; Rubio *et al.*, 2011), medidas en presencia de una concentración externa de 500 mM Na⁺. Esta diferencia en la actividad citoplasmática de Na⁺ de ambas especies puede deberse, como se ha mencionado anteriormente, a la mayor permeabilidad al Na⁺ observada en *H. portulacoides* respecto a la descrita en *Z. marina*. Por otra parte, los valores medidos en las plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia de tratamiento salino son similares a los descritos en una variedad de cebada tolerante a la salinidad citada anteriormente (28 mM Na⁺) cultivada en presencia de 25 mM NaCl durante 8 días (Carden *et al.*, 2003). Asimismo, el valor de Na⁺c obtenido en las plántulas cultivadas en presencia de 300 mM NaCl está en el rango de los valores estimados en raíces de halófitas terrestres utilizando técnicas indirectas, entre 70 y 200 mM Na⁺ en condiciones de cultivo entre 50 y 400 mM NaCl (Flowers y Colmer, 2008; Flowers *et al.*, 2015). No obstante, las medidas directas realizadas por electrofisiología en *H. portulacoides* sugieren que la actividad citoplasmática de sodio estaría más bien en los valores inferiores del rango propuesto por estos autores. Sin embargo, son necesarias más medidas en especies halófitas para determinar cuál sería el rango habitual de actividades citoplasmáticas de Na⁺ y K⁺ en este grupo de plantas.

Asumiendo que las medidas directas de actividades iónicas en el citoplasma son escasas, especialmente en la literatura de halófitos, recientemente Flowers y colaboradores (2015) han propuesto una relación Na^+/K^+ para el citoplasma de halófitos, basada en estimaciones, de 0,5 a 1. En el caso de *H. portulacoides* los resultados descritos en esta memoria muestran que esta relación es de 0,34 en las células de raíz de plantas cultivadas en ausencia de tratamiento salino y de 1,3 en las cultivadas en presencia de 300 mM (Tabla 18), valores dentro del rango propuesto. No obstante, este resultado indica que la ratio citoplasmática Na^+/K^+ se incrementa casi en cuatro veces en las células radiculares de las plántulas cultivadas en presencia de 300 mM NaCl respecto a condiciones sin sal. En comparación con el incremento en 16 veces de la relación Na^+/K^+ obtenida a partir de los contenidos totales de Na^+ y K^+ en las raíces de las plántulas cultivadas en las mismas condiciones, este resultado sugiere la existencia de un sistema de compartimentación que permitiría la acumulación de Na^+ en las raíces de *H. portulacoides*, frente a mecanismos de extrusión de Na^+ a través de la membrana plasmática observados en otras especies.

Tabla 18. Índice $\text{Na}^+_{\text{c}}/\text{K}^+_{\text{c}}$, en células epidérmicas de la raíz de plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia o presencia de 300 mM NaCl. Los datos se calcularon con los valores de actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+_{c}) y K^+ (K^+_{c}) mostrados en las tablas 12, 16 y 17.

	Na^+_{c} (mM)	K^+_{c} (mM)	$\text{Na}^+_{\text{c}} / \text{K}^+_{\text{c}}$
0 mM NaCl	26 ± 3	76 ± 4	0,34
300 mM NaCl	72 ± 5	55 ± 6	1,31

Considerando los valores negativos del potencial de membrana y dado que las concentraciones externas de Na^+ son elevadas en un ambiente salino, termodinámicamente la extrusión de Na^+ desde el citoplasma hacia el medio externo debe ser activa. Así, puesto que en plantas vasculares no se han encontrado bombas de Na^+ (Garcia-deblás *et al.*, 2001), el principal mecanismo de transporte de la membrana plasmática involucrado en el mantenimiento de la homeostasis citoplasmática de Na^+ se considera debida al antiportador Na^+/H^+ , SOS1. Descrito inicialmente en *Arabidopsis* (Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2003), su presencia se ha relacionado con la tolerancia a estrés salino tanto en especies glicófitas (Mullan *et al.*, 2007) como en halófitas (Chen *et al.*, 2010). Si bien se ha descrito la expresión constitutiva de este antiportador en halófitos terrestres como *Mesembryantum cristalinum* (Barkla *et al.*, 2002) y

Thellungiella halophila (Vera-Estrella *et al.*, 2005) y en la fanerógama marina *Cymodocea nodosa* (Garcia-deblás *et al.*, 2007), su actividad no se ha caracterizado en la mayoría de las especies en las que se ha encontrado el gen. No obstante, se ha detectado una elevada actividad de antiporte Na^+/H^+ de tipo SOS1 en variedades de trigo tolerantes a la salinidad (Cuin *et al.*, 2011). Por otra parte, en el caso de *Zostera marina* se ha caracterizado la actividad de antiporte Na^+/H^+ a nivel de membrana plasmática como mecanismo fundamental, junto a la permeabilidad restringida a Na^+ , para el mantenimiento de la baja concentración de sodio citoplasmática observada en esta especie (Rubio *et al.*, 2011). En esta fanerógama marina se encontró además un incremento de la actividad citoplasmática de Na^+ en presencia de inhibidores de la respiración (Rubio *et al.*, 2011). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta memoria han sido distintos a los observados en *Z. marina*, pues *H. portulacoides* presenta una mayor concentración de sodio citoplasmático, que se mantiene constante (en plantas cultivadas en ausencia de sal) o disminuye ligeramente (en plántulas cultivadas en 300 mM Na^+), en presencia de inhibidores de la respiración (Figs. 41 y 42), los cuales reducirían la actividad de los sistemas de transporte activo. Ello parece sugerir que en *H. portulacoides* el papel de este antiportador no sería fundamental en su mecanismo de tolerancia a la salinidad. Esto parece coincidir con lo observado en otras especies halófitas, donde no se ha podido detectar actividad Na^+/H^+ en el plasmalema.

En el caso de las halófitas se cree que los antiportadores NHX localizados en el tonoplasto podrían tener un papel importante en la compartimentación de Na^+ en la vacuola, tal como se había propuesto inicialmente para glicófitas (Blumwald, 2000; Tester y Davenport, 2003; Zhu, 2003). Sin embargo, las evidencias fisiológicas del funcionamiento de este tipo de antiportadores también son escasas en la literatura de halófitos (Flowers y Colmer, 2008), mientras que para diferentes especies glicófitas se ha descrito que la sobreexpresión de este tipo de antiportadores confiere tolerancia a la salinidad (Apse *et al.*, 1999; Zhang y Blumwald, 2001). No obstante, se ha demostrado que los antiportadores de este tipo, localizados en el tonoplasto, contribuyen principalmente a la compartimentación de K^+ en la vacuola (Venema *et al.*, 2003; Leidi *et al.*, 2009; Barragán *et al.*, 2012; Bassil *et al.*, 2010; Huertas *et al.*, 2013) y que la mayor tolerancia a la salinidad observada en el caso de las líneas sobreexpresoras de este antiportador se debe a una mejora en la nutrición de K^+ (Leidi *et al.*, 2009; Huertas *et al.*, 2013). En el caso de las especies halófitas, se han aislado los genes que codifican

para este tipo de transportadores en diversas especies, *Atriplex gmelini* (Hamada *et al.*, 2001), *Mesembryanthemum crystallinum* (Chauhan *et al.*, 2000), *Atriplex dimorphostegia* (Li *et al.*, 2003), *Suaeda salsa* (Ma *et al.*, 2004) y *Zygophyllum xanthoxylum* (Yuan *et al.*, 2015), cuya expresión se considera constitutiva (Barkla *et al.*, 1995; Glenn *et al.*, 1999). Aunque no existen evidencias directas, usando los valores obtenidos mediante las estimaciones de la concentración de sodio en el citoplasma y en la vacuola, así como de la relación Na^+/K^+ en ambos compartimentos, Flowers y Colmer (2008) propusieron que en Chenopodiaceas como *Suaeda maritima* la acumulación de Na^+ en la vacuola sería de 1 a 7 veces la concentración del citoplasma. Por otra parte, la relación Na^+/K^+ en la vacuola es de 12 a 15 veces mayor respecto a la del citoplasma tanto en *S. maritima* como en *Atriplex spongiosa* (Flowers y Colmer, 2008) y 18 veces mayor en el caso de *Z. marina* (Ye y Zhao, 2003) que acumularía más Na^+ en la vacuola respecto a las Chenopodiaceas (Flowers y Colmer, 2008). Aunque estas predicciones están hechas en tallos y hojas, los datos de la presente memoria no permiten descartar el papel de la compartimentación de Na^+ en la vacuola de las células de la raíz de *H. portulacoides*, dado que el incremento de la concentración citoplasmática de Na^+ en plantas cultivadas en 300 mM Na^+ supone únicamente en torno al 34 % del incremento del contenido total de sodio observado en la raíz.

IV.4. Modelo de incorporación y homeostasis de Na^+ y K^+ en *H. portulacoides*

Los resultados obtenidos en la presente memoria permiten proponer un modelo sobre los procesos de incorporación de K^+ y Na^+ en distintas condiciones salinas (Fig. 43). Se trata de un modelo de índole principalmente termodinámica, basado en las medidas de potenciales de membrana y de concentraciones citoplasmáticas de K^+ y Na^+ , que indica que el transporte de ambos iones sería pasivo y, por tanto, podría producirse a través de canales, en las condiciones de cultivo ensayadas y en el rango de concentraciones externas analizados (en torno a 1 mM). Así, el gradiente de potencial electroquímico para K^+ presenta valores negativos tanto en ausencia como en presencia de 300 mM Na^+ , aunque el valor de este gradiente es menor en presencia de 300 mM Na^+ , dado que en estas condiciones aunque la concentración citoplasmática de K^+ disminuye con respecto al control, el potencial de membrana se hace más positivo.

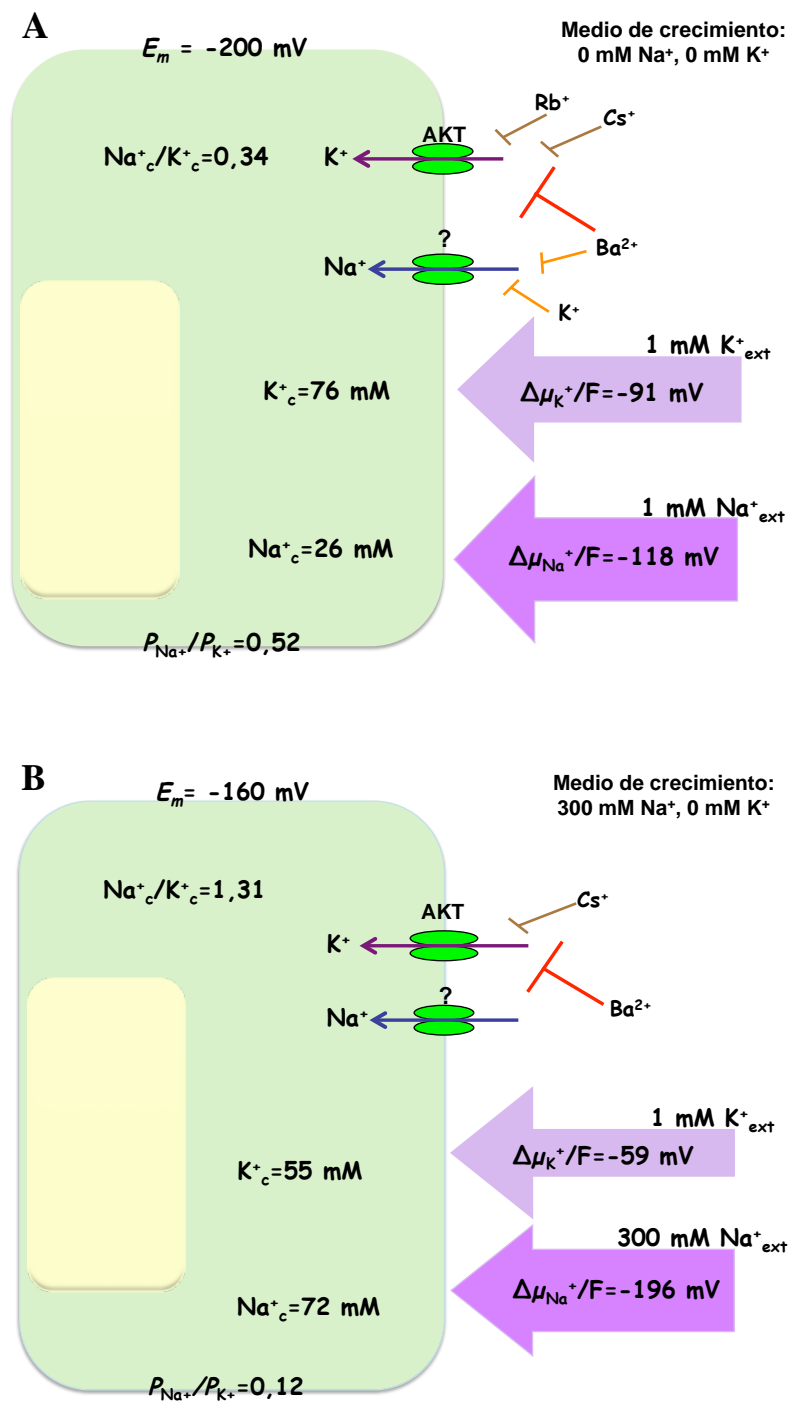


Figura 43. Modelo de incorporación y homeostasis de Na⁺ y K⁺ en *H. portulacoides*. Se indican los valores de potencial de membrana (E_m , en mV), permeabilidad relativa de la membrana al Na⁺ con respecto a K⁺ ($P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+}$), actividad citoplasmática (en mM) de Na⁺ (Na^+_c) y K⁺ (K^+_c) y ratio $\text{Na}^+_c/\text{K}^+_c$ medidos en plantas crecidas en ausencia (A) o en presencia de 300 mM Na⁺ (B). Se muestran los valores de potencial electroquímico, en mV, para K⁺ ($\Delta\mu_{\text{K}^+}/F$) y Na⁺ ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}/F$) a la concentración externa indicada. Dichos gradientes tendrían valores negativos a partir de una concentración externa de 0,02 mM K⁺ y 0,01 mM Na⁺ en A y de 0,12 mM K⁺ en B. Además, se señala el efecto inhibitorio de distintos compuestos sobre el transporte de K⁺ y Na⁺. Se propone que el transporte de K⁺ se daría a través canales de tipo AKT, mientras que los canales que permiten el transporte de Na⁺, diferentes a los de K⁺, no se han identificado.

El tipo de canal implicado en el transporte de K^+ tanto en ausencia como en presencia de Na^+ sería con bastante probabilidad un canal de tipo AKT, considerando el resultado del análisis con inhibidores e iones. Por otra parte, el valor de K_m obtenido para el transporte de K^+ en ayuno de este ión indica que esta especie carece de un transporte de K^+ de alta afinidad en la raíz. La presencia y expresión de transportadores tipo HAK, así como de canales AKT, en las raíces de esta planta deberá confirmarse mediante técnicas moleculares, como ya se ha hecho en algunas especies de halófitas, donde se ha observado la expresión de ambos tipos de proteínas transportadoras (Sue *et al.*, 2001; Sue *et al.*, 2002; Garcíadeblás *et al.*, 2002). Sin embargo, el papel de los HAK como transportadores de K^+ de alta afinidad, tal y como se describe en raíces de glicófitos, puede descartarse en *H. portulacoides*. No obstante, la inhibición del transporte por NH_4^+ en ausencia de Na^+ , no permite excluir del todo la participación de este tipo de transportadores en el transporte de K^+ en *H. portulacoides*. De hecho, en la halófito marina *Cymodocea nodosa*, se ha determinado que los genes HAK presentes en sus hojas codifican un transportador de K^+ de baja afinidad (Garcíadeblás *et al.*, 2002).

También en el caso del Na^+ , el gradiente de potencial electroquímico para este ión presenta valores negativos, ligeramente superiores al gradiente de K^+ para la misma concentración externa, en plantas crecidas en ausencia de ambos iones. En cuanto a la naturaleza de los canales que permitirían el transporte de Na^+ a bajas concentraciones, el análisis farmacológico no apunta directamente a ningún tipo de canal de los propuestos para el transporte de Na^+ en otras especies, pero sí indica que sería un canal distinto al implicado en el transporte de K^+ . El valor de K_m obtenido para el transporte de Na^+ en ayuno de K^+ y Na^+ señala que no existe un transporte de Na^+ de alta afinidad, tal y como se ha descrito en glicófitos, pero sí que la planta tiene la capacidad de incorporar Na^+ en el rango micromolar.

El valor del gradiente de potencial electroquímico para Na^+ a concentraciones elevadas de este ión (300 mM Na^+) muestra obviamente valores más negativos, a pesar del incremento de la concentración citoplasmática de Na^+ y de la despolarización de la membrana. Por tanto, el Na^+ , como se ha propuesto repetidamente para estas condiciones, podría pasar a través de canales al interior celular. No obstante, la entrada de Na^+ en alta salinidad se ve restringida con respecto a la de K^+ en estas condiciones. Es decir, que aunque la permeabilidad de la membrana plasmática al Na^+ no varía en las

dos condiciones, sí aumenta la permeabilidad al K^+ en condiciones salinas. Ello podría indicar la existencia de algún tipo de regulación de los canales de K^+ en condiciones de salinidad, que favorezca el mantenimiento de un índice Na^+/K^+ citoplasmático compatible con la actividad metabólica. El valor de este índice (1,31), podría no ser muy distinto en las condiciones del estuario donde la proporción entre las concentraciones externas Na^+/K^+ oscila entre 100 y 60, aproximadamente, dependiendo de la estación (Palomo, 2004). No obstante, sería necesario realizar medidas de potenciales de membrana y de concentraciones citoplasmáticas de K^+ y Na^+ en plantas adultas procedentes de estuario para tener una visión más completa sobre la homeostasis citoplasmática de estos iones.

CONCLUSIONES

V. Conclusiones

1. Las raíces de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ son capaces de incorporar K^+ de soluciones externas que contienen concentraciones micromolares de este ión. Sin embargo, la afinidad de este transporte ($K_m \approx 300 \mu M$) no es tan alta como la descrita para el transporte de potasio de alta afinidad en glicófitos.
2. La afinidad por K^+ y la velocidad máxima de transporte disminuyen en plantas cultivadas en condiciones salinas ($300 \text{ mM } Na^+$). No obstante, a estas concentraciones de Na^+ , próximas a los valores que se miden en el medio donde crece esta especie, las células de la raíz son capaces de mantener un potencial de membrana altamente negativo, lo cual es esencial para mantener la capacidad de absorción de K^+ y de otros nutrientes.
3. Los efectos producidos por distintos inhibidores específicos del transporte de K^+ y el cálculo del gradiente de potencial electroquímico de este ión sugieren que dicho transporte se produce principalmente a través de canales de potasio de tipo AKT, en plantas cultivadas tanto en presencia como en ausencia de sodio. Sin embargo, no se puede excluir que transportadores de tipo HAK puedan estar implicados de manera limitada en el transporte de K^+ en plantas cultivadas en ausencia de sodio.
4. Las raíces de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ son capaces de incorporar Na^+ de soluciones externas que contienen concentraciones micromolares de este ión. No obstante, la afinidad mostrada por este transporte ($K_m \approx 600 \mu M$) indica que esta especie carece de un transporte de sodio de alta afinidad como el descrito en plantas glicófitas.
5. La respuesta del transporte de Na^+ y K^+ frente a distintos inhibidores indica que el transporte de Na^+ se produce a través de transportadores distintos a los usados por K^+ . Los valores del gradiente de potencial electroquímico indican que el transporte de Na^+ sería pasivo, es decir, se produciría a través de canales cuya identidad no se ha podido determinar con el uso de inhibidores.

6. Las actividades citoplasmáticas de K^+ y Na^+ en las células epidérmicas de la raíz de plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en ausencia de Na^+ y de K^+ son similares a las descritas en glicófitos (≈ 76 mM y ≈ 26 mM, respectivamente) y determinan un índice Na^+/K^+ citoplasmático próximo a 0,34. En estas mismas condiciones, la permeabilidad de la membrana al K^+ es solo ligeramente mayor que la permeabilidad al Na^+ .
7. En plántulas cultivadas en tratamiento salino, la actividad citoplasmática de K^+ disminuye en las células epidérmicas de la raíz (≈ 55 mM), como ocurre en glicófitos. En cambio, la actividad citoplasmática de Na^+ aumenta en estas condiciones (≈ 72 mM), mostrando valores superiores a los observados en glicófitos en condiciones salinas. Ello se traduce en que el índice Na^+/K^+ en el citoplasma se multiplique por cuatro (1,3) en condiciones salinas.
8. Los valores de permeabilidad relativa, P_{Na^+}/P_{K^+} , de la membrana de células radicales de esta especie son consistentes con un mecanismo de tolerancia a la salinidad de tipo inclusor. No obstante, la permeabilidad de la membrana al K^+ es mucho mayor que al Na^+ en condiciones salinas, lo que concuerda con la alta capacidad de incorporación de K^+ observada en medio salino.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams P, Nelson D, Yamada S, Chmara W, Jensen RG, Bohnert HJ, Griffiths H (1998). Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *New Phytologist* 138: 171-190.
- Ait Hammou K, Rubio L, Fernández JA, García-Sánchez MJ (2014). Potassium uptake in the halophyte *Halimione portulacoides* L. Aellen. *Environmental and Experimental Botany* 107: 15-24.
- Alemán F, Nieves-Cordones M, Martinez V, Rubio F (2009). Differential regulation of the *HAK5* genes encoding the high-affinity K^+ transporters of *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* 65: 263-269.
- Alemán F, Nieves-Cordones M, Martinez V, Rubio F (2011). Root K^+ Acquisition in Plants: The *Arabidopsis thaliana* Model. *Plant Cell Physiol* 52(9): 1603–1612.
- Ali Z, Park H C, Ali A, Oh D-H, Aman R, Kropornicha A, Hong H, Choi W, Chung WS, Kim W-Y, Bressan RA, Bohnert H J, Lee S Y, Yun D-J (2012). TsHKT1;2, a HKT1 homolog from the extremophile *Arabidopsis* relative *Thellungiella salsuginea*, shows K^+ specificity in the presence of NaCl. *Plant Physiology* 158: 1463-1474.
- Ammann D (1986). Ion-selective microelectrodes. Principles, design and applications. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.
- Amtmann A, Beilby M J (2010). The role of ion channels in plant salt tolerance. En: Demidchik V, Maathuis F, (Eds), *Ion channels and plant stress responses, Signalling and Communication in Plants*, Springer, Berlin, 23-46 pp.
- Amtmann A, Fischer M, Marsh El, Stefanovic A, Sanders D, Schachtman DP (2001). The wheat cDNA LCT1 generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiology* 126: 1061-1071.
- Amtmann A, Gradmann D (1994) Na^+ transport in *Acetabularia* bypasses conductance of plasmalemma. *The Journal of Membrane Biology* 139: 117-125.
- Amtmann A, Sanders D (1999). Mechanisms of Na^+ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research* 29: 75-112.
- Anderson W P, Willcocks D A, Wright B J (1977). Electrophysiological measurements on the root of *Atriplex hastata*. *Environmental and Experimental Botany* 28: 894-901.
- Anschütz U, Becker D, Shabala S (2014). Going beyond nutrition: regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *Journal of Plant Physiology* 171: 670 – 687.
- Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, Blumwald E (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/K^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Apse M P, Blumwald E (2007). Na^+ transport in plants. *FEBS Letters* 581: 2247-2254.

- Ashby WC, Beadle NCW (1957). Salinity factors in the growth of Australian saltbushes. *Ecology* 38: 344–352.
- Aslam Z, Jeschke W D, Barrett-Lennard E G, Setter T L, Watkin E, Greenway H (1986). Effects of external NaCl on the growth of *Atriplex amnicola* and the ion relations and carbohydrate status of the leaves. *Plant, Cell & Environment* 9: 571–580.
- Bañuelos M A, Garciadeblás B, Cubero B, Rodriguez-Navarro A (2002). Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiology* 130: 784 – 795.
- Barkla BJ, Zingarelli L, Blumwald E, Smith JAC (1995). Tonoplast Na^+/H^+ antiport activity and its energization by the vacuolar H^+ -ATPase in the halophytic plant *Mesembryantemum crystallinum* L. *Plant Physiology* 109: 549-556.
- Barkla GJ, Vera-Estrella R, Camacho-Emeterio J, Pantoja O (2002). Na^+/H^+ exchange in the halophyte *Mesembryantemum crystallinum* is associated with cellular sites of Na^+ storage. *Functional Plant Biology* 29: 1017-1024.
- Barragán V, Leidi E O, Andrés Z, Rubio L, De Luca A, Fernández J A, Cubero B, Pardo J M (2012). Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in Arabidopsis. *The Plant Cell* 24: 1127–1142.
- Bassil E, Tajima H, Liang Y C, Ohto M A, Ushijima K, Nakano R, Esumi T, Coku A, Belmonte M, Blumwald E (2011). The Arabidopsis Na^+/H^+ antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K^+ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *The Plant Cell* 23: 3482–3497.
- Beerbower (1985). Early development of continental ecosystems. In: *Geological Factors and the Evolution of Plants*. Edited by Tiffney, BH. 47-91. Yale University Press, New Haven, CT.
- Benito B, Haro R, Amtmann A, Cuin TA, Dreyer I (2014). The twins K^+ and Na^+ in plants. *Journal of Plant Physiology* 171: 723-731.
- Benlloch M, Moreno I, Rodriguez-Navarro A (1989). Two modes of rubidium uptake in sunflower plants. *Plant Physiology* 90: 939 – 942.
- Benzarti M, Ben Rejeb K, Debez A, Messedi D, Abdely C (2012). Photosynthetic activity and leaf antioxidative responses of *Atriplex portulacoides* subjected to extreme salinity. *Acta PhysiologiaePplantarum* 34: 1679 – 1688.
- Bertl A, Reid J D, Sentenac H, Slayman C L (1997). Functional comparison of plant inward-rectifier channels in yeast. *Environmental and Experimental Botany* 48: 405–413.
- Blumwald E (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 431-434.

- Bonales-Alatorre E, Shabala S, Chen ZH, Pottosin I (2013) Reduced tonoplast fast-activating and slow-activating channel activity is essential for conferring salinity tolerance in a facultative halophyte *Chenopodium quinoa*. *Plant Physiology* 162: 940 -952.
- Bose J, Rodrigo-Moreno A, Lai D, Xie Y, Shen W, Shabala S (2015). Rapid regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity is essential to salinity tolerance in two halophyte species, *Atriplex lentiformis* and *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany* 115(3): 481-494.
- Brito DT, Kronzucker H J (2008) Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiologia Plantarum* 133: 637-650.
- Carden D, Walker D, Flowers TJ, Miller AJ (2003). Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiology* 131: 676-683.
- Carden DE, Diamond D, Miller AJ (2001). An improved Na⁺-selective microelectrode for intracellular measurements in plant cells. *Journal of Experimental Botany* 52: 1353-1359.
- Castroviejo S (1990). *Halimione portulacoides*. En: Flora Iberica: *Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Vol 2. Castroviejo S, Lainz M, Lopez-González, Montserrat P, Garmendia M, Paiva J. (Eds) Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid 513-515.
- Chapman VJ (1950). Biological flora of the British isles: *Halimione portulacoides* (L.) Aell. *J. Ecology* 38: 214 – 222.
- Chauhan S, Forsthoefel N, Ran Y, Quigley F, Nelson D E, Bohnert H J (2000). Na⁺/myo-inositol symporters and Na⁺/H⁺-antiport in *Mesembryanthemum crystallinum*. *The Plant Journal* 24: 511-522.
- Cheeseman JM (2013). The integration of activity in saline environments: problems and perspectives. *Functional Plant Biology* 40: 759 – 774.
- Chen J A, Xiao Q A, Wu FH, Dong X J, He J X Pei Z M, Zheng H L (2010). Nitric oxide enhances salt secretion and Na⁺ sequestration in a mangrove plant, *Avicennia marina*, through increasing the expression of H⁺-ATPase and Na⁺/H⁺ antiporter under high salinity. *Tree Physiology* 30: 1570-1585.
- Clavero V, García-Vallejo P, Jiménez C, Fernández JA, Niell FX (1997). Eutrofización del estuario del Río Palmones. *Química Marina* VII: 115 – 122.
- Colmer TD, Fan TWN, Läuchli A, Higashi RM (1996) Interactive effects of salinity, nitrogen and sulfur on the organic solutes in *Spartina alterniflora* leaf blades. *Journal of Experimental Botany* 47: 369 – 375.
- Colmer TD, Flowers TJ (2008). Flooding tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179: 964 – 974.

- Corratge-Faillie C, Jabnourne M, Zimmermann S, Very AA, Fizames C, Sentenac H (2010). Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell Molecular Life Science* 67: 2511-2532.
- Cuin T A, Bose J, Stefano G, Jha D, Tester M, Mancuso S, Shabala S (2011). Assessing the role of root plasma membrane and tonoplast Na^+/H^+ exchangers in salinity tolerance in wheat: In planta quantification methods. *Plant, Cell and Environment* 34: 947 – 961.
- Cuin T A, Shabala S (2006). Potassium homeostasis in salinised plant tissues. En: Volkow A (Ed), *Plant Electrophysiology-Theory and Methods*. Springer, Heidelberg, Germany. 287-300 pp.
- Demidchik V, Maathuis FJM (2007). Physiological roles of non selective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist* 175: 387 – 404.
- Demidchik V, Tester MA (2002). Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plant plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. *Plant Physiology* 128: 379–387.
- Duarte B, Santos D, Marques J C, Cacador I (2013). Ecophysiological adaptations for two halophytes to salt stress: Photosynthesis, PS II photochemistry and anti-oxidant feedback-Implications for resilience in climate change. *Plant Physiology and Biochemistry* 67: 178 – 188.
- Elena B, Rubio L, García-Sánchez MJ, Fernández JA (2009). Incorporación de K^+ y Na^+ en *Sarcocornia perennis* (AJ. Scott). Comunicación Oral. Congreso de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Zaragoza. Libro de Resúmenes p 14.
- English J P, Colmer T D (2013). Tolerance of extreme salinity in two stem-succulent halophytes (*Tecticornia* species). *Functional Plant Biology* 40: 897 – 912.
- Epstein E, Rains DW, Elzam OE (1963). Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 49: 684 – 692.
- Felle H (1981). A study of the current-voltage relationships of electrogenic active and passive membrane elements in *Riccia fluitans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 646: 151–160.
- Felle H (1994). The H^+/Cl^- symporter in root-hair cells of *Sinapis alba*. An electrophysiological study using ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology* 106: 1131 – 1136.
- Felle H H, Hanstein S, Steinmeyer R, Hedrich R (2000). Dynamics of ionic activities in the apoplast of the substomatal cavity of intact *Vicia faba* leaves during stomatal closure evoked by ABA and darkness. *The Plant Journal* 24: 297- 304.
- Felle H, Bertl A (1986). The fabrication of H^+ selective liquid-membrane microelectrodes for use in plant cells. *Journal of Experimental Botany* 37: 1416 – 1428.

- Fernández JA, García-Sánchez MJ, Felle H (1999). Physiological evidence from a proton pump at the plasma membrane of the marine angiosperm *Zostera marina* L. *Journal of Experimental Botany* 50: 1763 – 1768.
- Flowers T J, Colmer TD (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179: 945 – 963.
- Flowers TJ (1985). Physiology of halophytes. *Plant and Soil* 89: 41 – 46.
- Flowers TJ, Galal HK, Bromham L (2010). Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology* 37: 604 – 612.
- Flowers TJ, Hajibagheri MA, Clipson NJW (1986). Halophytes. *The Quarterly Review of Biology* 61: 313 – 337.
- Flowers TJ, Munns R, Colmer TD (2015). Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of Botany* 115: 419 – 431.
- Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 28: 89 – 121.
- Flowers TJ, Yeo AR. (1988). Ion relation of salt tolerance. En: Baker DA, Hall JL, eds. *Solute Transport in Plant Cells and Tissues*, Harlow, UK: Longman Scientific and Technical 392–413 pp.
- Freitas H, Breckle S W (1992). Importance of bladder hairs for salt tolerance of field-grown *Atriplex* species from a Portuguese salt marsh. *Flora* 187: 283 – 297.
- Fu H H, Luan S (1998). AtKUP1: a dual-affinity K⁺ transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 63 – 73.
- Garciadeblás B, Benito B, Rodríguez-Navarro A (2001). Plant cells express several stress calcium ATPases but apparently no sodium ATPase. *Plant and Soil* 235: 181-192.
- Garciadeblás B, Benito B, Rodríguez-Navarro A (2002). Molecular cloning and functional expression in bacteria of the potassium transporters CnHAK1 and CnHAK2 of the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Plant Molecular Biology* 50: 623 – 633.
- Garciadeblás B, Haro R, Benito B (2007). Cloning of two SOS1 transporters from the seagrass *Cymodocea nodosa*. SOS1 transporters from *Cymodocea* and *Arabidopsis* mediate potassium uptake in bacteria. *Plant Molecular Biology* 63: 479-490.
- Garciadeblás B, Senn ME, Bañuelos MA, Rodríguez- Navarro A (2003). Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant Journal* 34: 788 – 801.
- Gierth M, Maser P (2007). Potassium transporters in plants – involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters* 581: 2348 – 2356.
- Glass ADM, Shaff J, Kochian LV (1992) Studies of the uptake of nitrate in barley: IV. Electrophysiology. *Plant Physiology* 99: 456 – 463.

- Glenn EP, Brown J, Blumwald E (1999) Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 227 – 255.
- Golldack D, Quigley F, Michalowski C B, Kamasani U R, Bohnert H J (2003). Salinity stress-tolerant and – sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT-1 type potassium channel transcripts differently. *Plant Molecular Biology* 51: 71 – 81.
- Greenway H, Munns R (1980). Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review Plant Physiology* 31: 149-190
- Hajibagheri MA, Hall JL, Flowers TJ (1984). Stereological analysis of leaf cells of the halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dum. *Journal of Experimental Botany* 35: 1547 – 1557.
- Hamada A, Shono M, Xia T, Ohta M, Hayashi Y, Tanaka A, Hayakawa T (2001). Isolation and characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelinii*. *Plant Molecular Biology* 46: 35 – 42.
- Hariadi Y, Marandon K, Tian Y, Jacobsen S-E, Shabala S (2011). Ionic and osmotic relations in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants grown at various salinity levels. *Journal of Experimental Botany* 62: 185–193.
- Haro R, Bañuelos MA, Rodríguez-Navarro A (2010). High affinity sodium uptake in land plants. *Plant Cell Physiology* 51: 68-79.
- Haro R, Bañuelos MA, Senn ME, Barrero-Gil J, Rodríguez-Navarro A (2005). HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiology* 139: 1495 – 1506.
- Hasegawa P M, Bressan R A, Zhu J-K, Bohnert H J (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463 – 499.
- Hasegawa PM (2013). Sodium (Na^+) homeostasis and salt tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany* 92: 19 – 31.
- Hedrich R, Schroeder J I (1989). The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 539 – 569.
- Hille B (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd ed. (Sunderland, MA: Sinauer Associates).
- Hirsch R E, Lewis B D, Spalding E P, Sussman M R (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280: 918 - 921.
- Hoagland D R, Arnon D I (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1 – 32.
- Horie T, Costa A, Kim TH, Han MJ, Horie R, Leung HY et al (2007). Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na^+ influx component into K^+ -starved roots for growth. *The EMBO Journal* 26: 3003 – 3014.

- Horie T, Hauser F, Schroeder J I (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends Plant Science* 14: 660 – 668.
- Horie T, Schroeder J I (2004). Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiology* 136: 2457 – 2462.
- Huertas R, Rubio L, Cagnac O, García-Sánchez M J, Alché J de D, Venema K, Fernández JA, Rodríguez-Rosales M P (2013). The K^+/H^+ antiporter LeNHX2 increases salt tolerance by improving K^+ homeostasis in transgenic tomato. *Plant Cell Environment* 36: 2135 – 2149.
- Izquierdo J J (2001). Aspectos del ciclo de los nutrientes no conservativos en el estuario del río Palmones. Tesis doctoral. Universidad de Málaga .
- Jefferies RL (1973). The ionic relations of seedlings of the halophyte *Triglochin maritima*. L. In: Anderson WP, ed. *Ion transport in plants*. London, UK, Academic Press, pp 297 – 321.
- Jensen A (1985). On the ecophysiology of *Halimione portulacoides*. In: Beeftink I W G, Rozema, J.M., Huiskes A H L. (Eds.), *Ecology of coastal vegetation. Advances in vegetation science, vol 6, Springer*, pp 231-240.
- Kakkar T, Boxenbaum H, Mayersohn M (1999). Estimation of K_i in a competitive enzyme-inhibition model: comparison among three methods of data analysis. *Drug Metabolism and Disposition* 27: 756 – 762.
- Kant S, Kant P, Raveh E, Barak S (2006). Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na^+ uptake in *T. halophila*. *Plant Cell and Environment* 29: 1220 – 1234.
- Khan M A, Ungar I A, Showalter A M, Dewald H D (1998). NaCl-induced accumulation of glycinebetaine in four subtropical halophytes from Pakistan. *Physiologia Plantarum* 102: 487 – 492.
- Khan MA, Ungar I A and Showalter AM (2000). Effects of salinity on growth, water relations and ion accumulation in the subtropical perennial halophyte, *Atriplex griffithii* var. *stocksii*. *Annals of Botany* 85: 225-232.
- Kochian LV, Lucas W J (1982). Potassium transport in corn roots. I. Resolution of kinetics into a saturable and linear component. *Plant Physiology* 70: 1723 – 1731.
- Kronzucker H J, Britto D T (2011). Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytologist* 189: 54 – 81.
- Kronzucker HJ, Coskun D, Schulze LM, Wong JR, Britto DT. (2013). Sodium as nutrient and toxicant. *Plant and Soil* 369: 1 – 23.
- Laties G C (1982). The cyanide resistant, alternative path in higher plant respiration *Annual Review of Plant Physiology* 33: 519-555.

- Lazof D, Cheeseman J M (1988). Sodium transport and compartmentation in *Spergularia marina*. Partial characterization of a functional symplasm. *Plant Physiology* 81: 742 – 747.
- Leidi E O, Barragan V, Rubio L, El-Hamdaoui A, Ruiz M T, Cubero B, Fernandez J A, Bressan R A, Hasegawa P M, Quintero F J, Pardo J M (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant Journal* 61: 495–506.
- Li JY, Zhang FC, Ma J, Cai L, Bao YG, Wang B (2003). Using RT-PCR to amplify the NHX gene fragment in *Atriplex dimorphostegia*. *Plant Physiology Communications* 39: 585–588.
- Ma X L, Zhang Q, Shi H Z, Zhu J K, Zhao Y X, Ma C L, Zhang H (2004). Molecular cloning and different expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene in *Suaeda salsa* under salt stress. *Biologia Plantarum* 48: 219-225.
- Maathuis F J M (2013). Sodium in plants: perception, signaling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany* 65: 849 – 858.
- Maathuis F J M, Amtmann A (1999). K^+ nutrition and Na^+ toxicity: the basis for cellular K^+/Na^+ ratios. *Annals of Botany* 84: 123–133.
- Maathuis F J M, Prins HBA (1990). Electrophysiological membrane characteristics of the salt tolerant *Plantago maritima* and the sensitive *Plantago media*. *Plant and Soil* 123: 233-238.
- Maathuis F J M, Sanders D (1996). Mechanisms of potassium absorption by higher plants roots. *Physiologia Plantarum* 96: 158 – 168.
- Maathuis F J, Sanders D (1994). Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 91: 9272 – 9276.
- Maathuis FJM, Flowers TJ, Yeo AR (1992). Sodium chloride compartmentation in leaf vacuoles of the halophyte *Suaeda maritima* (L) Dum and its relation to tonoplast permeability. *Journal of Experimental Botany* 43: 1219 – 1223.
- Marschner H (1995). Mineral nutrition of higher plants, 2nd ed. San Diego, Academic Press, London.
- Marschner P (2012). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3th edition. Academic Press, Elsevier, San Diego, 651 pp
- Martínez-Cordero MA, Martínez V, Rubio F (2004) Cloning and functional characterization of the high-affinity K^+ transporter HAK1 of pepper. *Plant Molecular Biology* 56: 413 – 421.
- Miller A J, Cookson S J, Smith S J, Wells D M (2001) .The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolised inorganic ions in plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 541 – 549.

- Mills D M, Robinson K, Hodges T K (1985). Sodium and potassium fluxes and compartmentation in roots of *Atriplex* and oat. *Plant Physiology* 78: 500 – 509.
- Mithöfer A, Ebel J, Felle H H (2005). Cation fluxes cause plasma membrane depolarization involved in beta-glucan elicitor-signaling in soybean roots. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18: 983 – 990.
- Mori S, Suzuki K, Oda R, Higuchi K, Maeda Y, Yoshiba M, Tadano T (2011). Characteristics of Na⁺ and K⁺ absorption in *Suaeda salsa* (L.) Pall. *Soil Science and Plant Nutrition* 57: 377 – 386.
- Mullan DJ, Colmer TD, Francki MG (2007) Arabidopsis-rice-wheat gene orthologues for Na⁺-transport and transcript analysis in wheat-*L. elongatum* aneuploids under salt stress. *Molecular Genetics and Genomics* 277, 199-212.
- Munns R, Tester M (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651–681.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment* 25: 239-250.
- Nieves-Cordones M, Alemán F, Martínez V, Rubio F (2010). The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. *Molecular Plant* 3: 326–333.
- Nieves-Cordones M, Martínez-Cordero M A, Martínez V, Rubio F (2007). An NH₄⁺-sensitive component dominates high-affinity K⁺ uptake in tomato plants. *Plant Science* 172: 273 – 280.
- Palomo L (2004). La influencia de *Sarcocornia perennis alpini* en el flujo de nutrientes del estuario del río Palmones. Tesis doctoral. Universidad de Málaga.
- Palomo L, Niell FX (2009). Primary production and nutrient budgets of *Sarcocornia perennis* ssp. *alpini* (Lag.) Castroviejo in the salt march of the Palmones River estuary (Southern Spain). *Aquatic Botany* 912: 130-136.
- Palomo L, Rubio L, Niell FX, Fernández JA (2005). Cinéticas y mecanismos de transporte de amonio y fosfato en *Sarcocornia perennis alpini*. IX Congreso Luso Español de Fisiología Vegetal. Libro de Resúmenes, p. 75.
- Parks GE, Dietrich MA, Schumaker KS (2002). Increased vacuolar Na⁺/H⁺ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany* 53: 1055 – 1065.
- Peng Y-H, Zhu Y-F, Mao Y-Q, Wang S-M, Su W-A, Tang Z-C (2004). Alkali grass resists salt stress through high [K⁺] and an endodermis barrier to Na⁺. *Journal of Experimental Botany* 55: 939 – 949.
- Pitman M, Laüchli A (2004). Global impact of salinity and agricultural ecosystems. En: Laüchli A, Lüttge U. eds. *Salinity: environment – plants – molecules*. Dordrecht: Kluwer 3–20.

- Qiu Q S, Barkla B J, Vera-Estrella R, Zhu J K, Schumaker K S (2003). Na^+/H^+ exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132: 1041-1052.
- Rains DW, Epstein E (1967). Sodium absorption in barley roots: role of the dual mechanisms of alkali cation transport. *Plant Physiology* 42: 314 – 318.
- Ramos J, López MJ, Benlloch M (2004). Effect of NaCl and KCl salts on the growth and solute accumulation of the halophyte *Atriplex nummularia*. *Plant and Soil* 259: 163 -168.
- Raven J A (1976). Transport in algal cells. En: Lütge U, Pitman M, eds., *Transport in plants II Part A Cells*, Encyclopedia of Plant Physiology New Series Volume 2, Springer, Berlin, 129-188 pp.
- Redondo-Gómez S, Mateos-Naranjo E, Davy A J, Fernández-Muñoz F, Castellanos E M, Luque T, Figueroa M E (2007). Growth and photosynthetic responses to salinity of the salt-marsh shrub *Atriplex portulacoides*. *Annals of Botany* 100: 555 – 563.
- Redondo-Gómez S, Rubio-Casal A E, Castillo J M, Luque C J, Álvarez A A, Luque T, Figueroa M E (2004). Influences of salinity and light on germination of three *Sarcocornia* taxa with contrasted habitats. *Aquatic Botany* 78: 255 – 264.
- Rodríguez-Navarro A (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1460: 1-30.
- Rodríguez-Navarro A, Rubio F (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 1149 – 1160.
- Rodríguez-Rosales MP, Galvez F J, Huertas R, Aranda M N, Baghour M, Cagnac O, Venema K (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signaling and Behaviour* 4: 265 – 276.
- Rubio F, Arévalo L, Caballero F, Botella M A, Rubio J S, García-Sánchez F, Martínez V (2010). Systems involved in K^+ uptake from diluted solutions in pepper plants as revealed by the use of specific inhibitors. *Journal of Plant Physiology* 167: 1494 – 1499.
- Rubio F, Nieves-Cordones M, Alemán F, Martínez V (2008). Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K^+ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiologia Plantarum* 134: 598 – 608.
- Rubio L (2004). Mecanismos de transporte de nitrato, amonio y fosfato y homeostasis citoplasmática de sodio en *Zostera marina* L. Tesis doctoral. Universidad de Málaga
- Rubio L, Belver A, Venema K, García-Sánchez MJ, Fernández JA (2011). Evidence for a sodium efflux mechanism in leaf cells of the seagrass *Zostera marina* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 402: 56 – 64.

- Rubio L, Linares-Rueda A, Dueñas C, Fernández M C, Clavero V, Niell F X, Fernández J A (2003). Sediment accumulation rate and radiological characterisation of the sediment of Palmones River estuary (southern of Spain). *Journal Environmental Radioactivity* 65: 267 – 280.
- Rubio L, Linares-Rueda A, García-Sánchez MJ, Fernández JA (2005). Physiological evidence for a sodium-dependent high-affinity phosphate and nitrate transport at the plasma membrane of leaf and root cells of *Zostera marina* L. *Journal of Experimental Botany* 56: 613 – 622.
- Rubio L, Rosado A, Linares-Rueda A, Borsani O, García-Sánchez MJ, Valpuesta V, Fernández JA, Botella M A (2004). Regulation of K^+ transport in tomato roots by the TSS1 locus: implications in salt tolerance. *Plant Physiology* 134: 452 – 459.
- Ruíz-Nieto (2014). Incorporación de carbono inorgánico en *Bostrychia scorpioides* (Hudson) Montagne ex Kützing y *Catenella caespitosa* (Withering) L.M.Irvine. Tesis doctoral. Universidad de Málaga.
- Santa-María G E, Danna C H, Czibener C (2000). High-affinity potassium transport in barley roots. Ammonium-sensitive and -insensitive pathways. *Plant Physiology* 123: 297 – 306.
- Santa-María GE, Rubio F, Dubcovsky J, Rodríguez-Navarro A (1997). The *HAK1* gene of barley is a member of a large family and encodes a high-affinity potassium transporter. *The Plant Cell* 9: 2281 – 2289.
- Schachtman D P, Schroeder J I (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370: 655 – 658.
- Schirmer U, Breckle SW (1982). The role of bladders for salt removal in some Chenopodiaceae (mainly *Atriplex* species). En: Sen DN, Rajpurohit KS eds, *Tasks for vegetation science, Vol 2. Contributions to the ecology of halophytes.*, Dr. W Junk Publishers, The Hague pp 215 – 231.
- Schulze LM, Britto DM, Li M, Kronzucker HJ (2012). A pharmacological analysis of high-affinity sodium transport in barley (*Hordeum vulgare* L): a $^{24}\text{Na}^+ / ^{42}\text{K}^+$ study. *Journal of Experimental Botany* 63: 2479 – 2489.
- Serrano R, Mulet J M, Rois G, Marquez J A, de Larrinoa I F, Leube M P, Mendizábal I, Pascual-Ahuir A, Proft M, Ros R, et al. (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany* 50: 1023 – 1036.
- Shabala S (2013). Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of Botany* 112: 1209 - 1221
- Shabala S, Bose J, Hedrich R (2014). Salt bladders: do they matter? *Trends in Plant Science* 19: 687 – 691.
- Shabala S, Cuin T A (2007). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* 133: 651 – 669.

- Shabala S, Mackay A (2011). Ion transport in halophytes. En: Turkan, I. (Ed.), *Plant Responses to Drought and Salinity Stress - Developments in a Post-Genomic Era. Advances in Botanical Research* 57: 151-199. Academic Press, Amsterdam.
- Shabala S, Munns R (2012). Salinity Stress: Physiological Constraints and Adaptive Mechanisms. En: *Plant Stress Physiology*. CAB International (Ed. S. Shabala) 59-93.
- Shabala S, Pottosin I (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia Plantarum* 151: 257 – 279.
- Shennan C, Hunt R, Macrobbe E A C (1987). Salt tolerance in *Aster tripolium* L. II. Ionic regulation. *Plant Cell and Environment* 10: 67-74.
- Shepherd UH, Bowling JF (1979). Sodium fluxes in roots of *Eleocharis uniglumis*, a brackish water species. *Plant Cell and Environment* 2: 123 – 140.
- Shi H Z, Ishitani M, Kim C S, Zhu J K (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiport. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 97: 6896-6901.
- Sousa AI, Cacador LAI, Pardal A (2008) Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: intra- and extra-cellular metal binding sites. *Chemosphere* 70: 850 – 857.
- Spalding E P, Hirsch R E, Lewis D R, Qi Z, Sussman M R, Lewis B D (1999). Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity- inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *Journal of General Physiology* 113: 909 – 918.
- Stewart G R, Larher F, Ahmed I, Lee J A (1979). Nitrogen metabolism and salt tolerance in higher plant halophytes. En: Jefferies R L, Davy A J, (Eds.), *Ecological processes in coastal environments*. Oxford Blackwell Scientific Publications 211 – 228 pp.
- Subbarao G V, Ito O, Berry W L, Wheeler R M (2003) Sodium-a functional plant nutrient Critical Review. *Plant Science* 22: 391 – 416.
- Sue H, Balderas E, Vera-Estrella R, Golldack D, Quigley F, Zhao C, Pantoja O, Bohnert H J (2003). Expression of the cation transporter McHKT1 in a halophyte. *Plant Molecular Biology* 52: 967 – 980.
- Sue H, Golldack D, Katsuhara M, Zhao C, Bohnert H J (2001). Expression and stress-dependent induction of potassium channels transcripts in the common ice plant. *Plant Physiology* 125: 604 – 614.
- Sue H, Golldack D, Zhao C, Bohnert H (2002). The expression of HAK-type K⁺ transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. *Plant Physiology* 129: 1482 – 1493.

- Szczerba M W, Britto D T, Kronzucker H J (2009). K^+ transport in plants: Physiology and molecular biology. *Journal of Plant Physiology* 166: 447 – 466.
- Taji T, Seki M, Satou M, Sakurai T, Kobayashi M, Ishiyama K, Narusaka Y, Narusaka M Zu J K, Shinozaki K (2004). Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiology* 135: 1697 – 1709.
- Tester M (1990). Plant ion channels: whole cell and single channel studies. *New Phytologist* 114: 305 – 340.
- Tester M, Davenport R (2003). Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503-527.
- Türkan I, Demiral T (2009). Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67: 2 – 9.
- Tyerman SD, Skerrett IM (1999). Root ion channels and salinity. *Scientia Horticulturae* 78: 175 – 235.
- Venema K., Belver A., Marín-Manzano M.C., Rodríguez-Rosales M.P. & Donaire J.P. (2003) A novel intracellular K^+/H^+ antiporter related to Na^+/H^+ antiporters is important for K^+ ion homeostasis in plants. *Journal of Biological Chemistry* 278: 22453–22459.
- Vera-Estrella R, Barkla B J, Garcia-Ramirez L, Pantoja O (2005). Salt stress in *Thellungiella halophila* activate Na^+ transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiology* 139: 1507 – 1517.
- Very A-A, Bosseux C, Gaymard F, Sentenac H, Thibaud H-D (1994). Level of expression in *Xenopus* oocytes affects some characteristics of a plant inward-rectifying voltage- gated K^+ channel. *Pflügers Archives* 428: 422 -424.
- Volkov V, Amtmann A (2006). *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, has specific root ion-channel features supporting K^+/Na^+ homeostasis under salinity stress. *Plant Journal* 48: 342 – 353.
- Volkov V, Wang B, Dominy PJ, Fricke W, Amtmann A (2004). A salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, possesses effective mechanisms to discriminate between potassium and sodium. *Plant Cell and Environment* 27: 1 – 14.
- Walker D J, Leigh R A, Miller A J (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 10510 – 10514.
- Walker D J, Smith S J, Miller A J (1995). Simultaneous measurement of intracellular pH and K^+ or NO_3^- in barley root cells using triple-barrelled, ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology* 108: 743 – 751.

- Wang B, Davenport RJ, Volkov V, Amtmann A (2006). Low unidirectional sodium influx into root cells restricts net sodium accumulation in *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 57: 1161 – 1170.
- Wang B, Lüttge U, Ratajczak R (2001). Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *Journal of Experimental Botany* 52: 2355 – 2365.
- Wang S-M, Zhang J-L, Flowers T F (2007). Low-affinity Na⁺ uptake in the halophyte *Suaeda maritima*. *Plant Physiology* 145: 559 – 571.
- White PJ, Broadley MR (2001). Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany* 88: 967 – 988.
- Wickens L K, Cheeseman J M (1991). Sodium and potassium relations of *Spergularia marina* following N and P deprivation: results of short-term growth studies. *Physiologia Plantarum* 81: 65 – 72.
- Wyn Jones G, Gorham J. (2002). Intra- and inter-cellular compartments of ions. In: Läuchli A, Lüttge U, (Eds.) *Salinity: environment-plant-molecules*, Dordrecht, the Netherlands; Kluwer, 159-180 pp.
- Ye C J, Zhao K F (2003). Osmotically active compounds and their localization in the marine halophyte eelgrass. *Biologia Plantarum* 46: 137-140.
- Yeo A R, Flowers T J (1986). Ion transport in *Suaeda maritima*: its relation to growth and implications for the pathway of radial transport of ions across the root. *Journal of Experimental Botany* 37: 143 – 159.
- Yeo AR (1983). Salinity resistance: physiology and prices. *Physiologia Plantarum* 58: 214 – 222.
- Yuan H-J, Ma Q, Wu G-Q, Wang P, Hu J, Wang S-M (2015). ZxNHX controls Na⁺ and K⁺ homeostasis at the whole-plant level in *Zygophyllum xanthoxylum* through feedback regulation of the expression of genes involved in their transport. *Annals of Botany* 115: 495-507.
- Zhang H X, Blumwald E (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology* 19: 765-768.
- Zhang J L, Flowers T J, Wang S M (2010). Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. *Plant and Soil* 326: 45-60.
- Zhang J-L, Flowers TJ, Wang S-M (2013). Differentiation of low-affinity Na⁺ uptake pathways and kinetics of the effects of K⁺ on Na⁺ uptake in the halophyte *Suaeda maritima*. *Plant and Soil* 368: 629-640.
- Zhu JK. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 441-445.

ÍNDICE DE FIGURAS

Índice de Figuras

Figura 1. Sistemas de transporte implicados en el transporte de K^+ (A) y Na^+ (B) en células radiculares.	12
Figura 2. Dibujo esquemático de la planta <i>H. portulacoides</i> .	24
Figura 3. Marisma del Río Palmones (Cádiz).	25
Figura 4. Plántulas de <i>H. portulacoides</i> tras dos días en agua destilada.	26
Figura 5. Cultivo de las plántulas obtenidas tras la germinación de semillas hidroponía	27
Figura 6. Microelectrodo introducido en una célula de la epidermis radicular de <i>H. portulacoides</i> .	28
Figura 7. Componentes de un puesto de electrofisiología (A) y detalle de la cámara de perfusión y microelectrodos.	31
Figura 8. Microelectrodo doble conectado a las sondas A y B del electrómetro	34
Figura 9. Incorporación de K^+ en raíces de <i>H. portulacoides</i> .	55
Figura 10. Despolarizaciones de la membrana inducidas por concentraciones crecientes de K^+ .	56
Figura 11. Despolarizaciones de la membrana inducidas por K^+ en células de la raíz de <i>H. portulacoides</i> .	57
Figura 12. Despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ , Rb^+ y Cs^+ en células de la raíz de <i>H. portulacoides</i> .	58
Figura 13. Efecto del ión Rb^+ sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ .	59
Figura 14. Representación de Lineweaver-Burk del efecto de la presencia de Rb^+ .	60
Figura 15. Representación de K_m/V_{max} frente a concentración del inhibidor (Rb^+).	61
Figura 16. Efecto del ión Cs^+ sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ .	62
Figura 17. Efecto del ión Na^+ sobre las despolarizaciones de la membrana inducidas por K^+ .	63
Figura 18. Despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ en plantas cultivadas a diferentes concentraciones de Na^+ .	64
Figura 19. Efecto del Cs^+ sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ en plantas cultivadas a diferentes concentraciones de Na^+ .	66
Figura 20. Efecto del TEA^+ sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ en plantas cultivadas a diferentes concentraciones de Na^+ .	67
Figura 21. Efecto del Ba^{2+} sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ en plantas cultivadas a diferentes concentraciones de Na^+ .	68

Figura 22. Efecto de distintos inhibidores sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por 1 mM K^+ en plantas cultivadas a diferentes concentraciones de Na^+ .	69
Figura 23. Efecto del pH sobre las despolarizaciones de membrana inducidas por 1 mM K^+ en plantas cultivadas en distintas concentraciones de Na^+ .	70
Figura 24. Despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ en las plantas preincubadas en 2 mM $CaCl_2$ ó 2mM $Ca(NO_3)_2$.	72
Figura 25. Despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ en plantas cultivadas en 2 mM $Ca(NO_3)_2$ ó 2mM $Ca(NO_3)_2$ + 1 mM NH_4^+ .	73
Figura 26. Efecto del amonio en plantas cultivadas en 300 mM NaCl.	74
Figura 27. Gradiente de potencial electroquímico para K^+ ($\Delta\mu K^+ /F$, en mV) a concentraciones crecientes del mismo en plántulas cultivadas en ausencia o presencia de 300 mM NaCl.	76
Figura 28. Incorporación de Na^+ en raíces of <i>H. portulacoides</i> .	77
Figura 29. Despolarizaciones de la membrana inducidas por concentraciones crecientes de Na^+ .	78
Figura 30. Despolarizaciones de membrana inducidas por Na^+ en células radiculares de <i>H. portulacoides</i> .	79
Figura 31. Efecto de Rb^+ (A), Cs^+ (B) y Ba^+ (C) sobre las despolarizaciones inducidas por Na^+ y K^+ en células radiculares de <i>H. portulacoides</i> .	80
Figura 32. Despolarizaciones de la membrana inducidas por Na^+ en plantas crecidas en presencia de Na^+ o K^+ .	81
Figura 33. Efecto de la presencia de K^+ sobre las despolarizaciones inducidas por Na^+ .	82
Figura 34. Efecto de Li^+ y Ca^{2+} sobre las despolarizaciones inducidas por Na^+ .	83
Figura 35. Efecto del pH sobre las despolarizaciones inducidas por Na^+ .	84
Figura 36. Gradiente de potencial electroquímico para Na^+ ($\Delta\mu Na^+ /F$) a distintas concentraciones externas de dicho ión.	85
Figura 37. Efecto de la presencia de Na^+ sobre el crecimiento relativo de plántulas de <i>H. portulacoides</i> .	86
Figura 38. Variación del potencial de difusión en función de la concentración externa de Na^+ o K^+ .	88
Figura 39. Efecto de la variación de la concentración externa de Na^+ sobre el E_m y la actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+c) en plántulas cultivadas en ausencia de Na^+ .	91
Figura 40. Efecto de la variación de la concentración externa de Na^+ sobre el E_m y la actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+c) en plántulas cultivadas en presencia de 300 mM Na^+ .	93
Figura 41. Efecto de la adición de inhibidores de la respiración sobre el E_m y la actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+c) en células epidérmicas de la raíz de plántulas de <i>H. portulacoides</i> cultivadas en ausencia de NaCl.	95

- Figura 42.** Efecto de la adición de inhibidores de la respiración sobre el E_m y la actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+c) en células epidérmicas de la raíz de plántulas de *H. portulacoides* cultivadas en presencia de 300 mM NaCl. 95
- Figura 43.** Modelo de incorporación y homeostasis de Na^+ y K^+ en *H. portulacoides*. 119

ÍNDICE DE TABLAS

Índice de Tablas

Tabla 1. Efecto del Rb^+ sobre la cinética de incorporación de K^+ .	59
Tabla 2. Efecto del Cs^+ sobre la cinética de incorporación de K^+ .	62
Tabla 3. Efecto de la presencia de concentraciones milimolares de Na^+ sobre la cinética de transporte de K^+ .	64
Tabla 4. Efecto de las concentraciones de Na^+ usadas en el crecimiento sobre la cinética de transporte de K^+ .	65
Tabla 5. Potenciales de membrana (E_m , en mV) de células radiculares en ausencia (control) y en presencia de 500 μM Cs^+ en medios con diferente concentración de Na^+ .	67
Tabla 6. Potenciales de membrana (E_m , en mV) de células radiculares en ausencia (control) y en presencia de 5 mM TEA^+ .	68
Tabla 7. Potenciales de membrana (E_m , en mV) de células radiculares en ausencia (control) y en presencia de 5 mM Ba^{2+} .	69
Tabla 8. Efecto del pH sobre el potencial de membrana en plantas cultivadas en distintas concentraciones de Na^+ .	71
Tabla 9. Efecto de la presencia de nitrato en el medio de crecimiento sobre la cinética de transporte de K^+ .	72
Tabla 10. Efecto de la presencia de amonio en el medio de crecimiento sobre la cinética de transporte de K^+ en ausencia de Na^+ .	73
Tabla 11. Efecto de la presencia de NH_4^+ en el medio de crecimiento sobre la cinética de transporte de K^+ en presencia de 300 mM NaCl .	75
Tabla 12. Actividad citoplasmática de K^+ en células radiculares de plantas sometidas a deficiencia de K^+ y cultivadas sin o con Na^+ .	75
Tabla 13. Efecto del Li^+ y del Ca^{2+} sobre los potenciales de membrana en plántulas cultivadas en ausencia de K^+ y Na^+ .	83
Tabla 14. Contenido total de Na^+ y K^+ en raíces y cotiledones de plántulas de <i>H. portulacoides</i> cultivadas en ausencia o en presencia de 300 mM NaCl .	87
Tabla 15. Permeabilidad relativa de la membrana a Na^+ y K^+ de células epidérmicas de la raíz de plántulas de <i>H. portulacoides</i> cultivadas en ausencia o en presencia de 300 mM NaCl .	89
Tabla 16. Valores de potencial de membrana y de actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+_{c}) en células epidérmicas de la raíz de plántulas de <i>H. portulacoides</i> cultivadas en condiciones control.	91
Tabla 17. Valores de potencial de membrana y de actividad citoplasmática de Na^+ (Na^+_{c}) en células epidérmicas de la raíz de plántulas de <i>H. portulacoides</i> cultivadas en presencia de 300 mM NaCl .	92
Tabla 18. Índice $\text{Na}^+_{\text{c}}/\text{K}^+_{\text{c}}$, células epidérmicas de la raíz de plántulas de <i>H. portulacoides</i> cultivadas en ausencia o presencia de 300 mM NaCl .	116



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

